

129 例ではフォロー中に肝発癌をみた例はなかった。

D. 考察

無症候性 HCV キャリアは女性に多く、症候性慢性肝炎に比して HCV group 2 の患者の比率が高かった。無症候性 HCV キャリアを一年間以上血清 ALT \leq 30IU/L を示し血小板数 \geq 150,000/ μ l と定義すると、肝への鉄沈着や酸化ストレス状態は症候性 C 型慢性肝炎より明らかに軽微で、90% 以上の症例は肝組織の炎症、線維化とも軽微で、長期フォローしても肝病変の進展も遅かった。

5 年以上フォローすると約 30% は症候性慢性肝炎になったが、129 例の無症候性 HCV キャリアからの肝発癌例はなかった。

なお、海外での無症候性 HCV キャリアへの peginterferon, ribavirin 併用 48 週間の大規模試験における著効率は症候性慢性肝炎とほぼ同程度であった。

E. 結論

今回の検討から、血小板数 150,000/ μ l 以上の患者を対象とした場合、無症候性 HCV キャリアの肝組織病変は軽微で、酸化ストレスも軽く、多くは予後良好である。定期的な経過観察後の肝機能検査の変化や組織の進展度を考慮し、血清 ALT 高値が持続し、肝組織の進展が見られるようになった時点で、年齢、病期などから抗ウイルス療法施行を行うか否かを決定す

ることが望ましいと思われる。

F. 健康危険情報

血小板数減少を伴わない、肝機能正常の C 型肝炎ウイルス持続陽性者(いわゆる無症候性 HCV キャリア)の多くは予後良好であり、基本的には経過観察でよい。経過観察の後に肝機能が持続異常を呈するようになれば、年齢、血清 ALT 値、線維化の程度など(血小板数など)を評価し、抗ウイルス療法を考慮し、通常慢性肝炎への治療に準じた方法で行う。

G. 研究発表

1. 発表論文

1) Okanoue T, Yasui K, Itoh Y. Practice of interferon therapy-chronic hepatitis C (combination with ribavirin). JMAJ 47: 64-68, 2004

2) Kasahara A, Tanaka H, Okanoue T, Imai Y, Tsubouchi H, Yoshioka K, Kawata S, Tanaka E, Hino K, Hayashi K, Tamura S, Itoh Y, Kiyosawa K, Kakumu S, Okita K, Hayashi N. Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death. J Viral Hepatitis. 11: 148-156, 2004

3) Makiyama A, Itoh Y, Kasahara A, Imai Y, Kawata S, Yoshioka K, Tsubouchi H, Kiyosawa K, Kakumu

S, Okita K, Hayashi N, Okanoue T. Characteristics of patients with chronic hepatitis C who develop hepatocellular carcinoma after a sustained response to interferon. *Cancer* 101: 1616-1622, 2004

4) Toyama T, Nakamura H, Harano Y, Yamauchi N, Morita A, Kirishima T, Minami M, Itoh Y, Okanoue T. PPAR α ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 697-704, 2004

5) Okanoue T, Nakayama M, Makiyama A, Sumida Y, Mitsufuji H, Nakajima T, Yasui K, Minami M, Itoh Y. Usefulness of liver biopsy

and follow-up study to decide candidates for antiviral therapy in HCV carriers with persistently normal aminotransferase. (in submission)

2. 学会発表

1) Okanoue T, Makiyama A, Nakayama M, Yasui K, Minami M, Itoh Y. Long term follow-up study of ALT normal HCV carriers. 40th Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 26th Hepatitis Panel Meeting. Dec 9, 2004, Kyoto, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書 IFN 治療の効果に及ぼす肥満の影響

分担研究者 鈴木一幸 岩手医科大学第一内科 教授

研究要旨：IFN α ・2b+リバビリン療法を受け追跡調査により治療効果が判明している 63 例について、遺伝子型より 1b 群(45 例)と non-1b 群(18 例)に分け、さらにそれぞれを肥満群と非肥満群に分けて HCV 陰性率を検討した。HCV 陰性化率は 1b 群(肥満群:28.6%、非肥満群:32.3%)、non 1b 群(肥満群:88.9%、非肥満群:44.4%)であり、non 1b 群の肥満群で高い結果が得られた。肥満群での比較では、有意に non 1b 群で HCV 陰性率が高かったが、これには IFN あるいはリバビリン治療薬の減量・中止例が少なかった事も大きな要因であった。肝脂肪変性率と各群での HCV 陰性率を検討すると、1b 群では脂肪変性率と明らかな関連はみられなかった(肝脂肪変性率 0:27%、10%以下:20%、10-30%:31%、30%以上:50%)が、non 1b 群では脂肪変性率が高度になるに従って HCV 陰性率は低下がみられた(肝脂肪変性率 0:67%、10%以下:60%、10-30%:50%、30%以上:0%)。以上より、IFN 療法の治療効果に肥満の影響が少なからず関係している可能性が示唆された。今後、症例数をさらに集積して IFN 治療における肥満あるいは肝脂肪化の影響を遺伝子型毎に検討する必要があると思われた。

共同研究者

阿部弘一	岩手医科大学第一内科 講師
佐藤慎一郎	岩手医科大学第一内科 助手
熊谷一郎	岩手医科大学第一内科 専門医員

れているが、わが国では体重あたりの IFN 投与量を決めている IFN 製剤は殆どない。C-CH のウイルス消失率 (SVR) は HCV の遺伝子型と HCV-RNA 量に影響を受ける事が明らかになっているため、IFN 投与量については患者の自覚症状あるいは副作用などをみながら適宜増減するのが通例である。しかしながら、C-CH の 30-70%の肝脂肪化がみられること、遺伝子型 3 では HCV のウイルス

A. 研究目的

C 型慢性肝炎(C-CH)に対する IFN 療法の標準化のガイドラインが示さ

量と肝の脂肪化が相関し、IFN療法を行うとSVR例ではBMI(body mass index)に関わらず肝脂肪化の改善がみられることが報告されている。わが国では肥満を有するC-CHに対するIFN療法の効果については十分に検討されておらず、今後、IFN療法の標準化を推進する上ではこの点を明らかにしておく事が必要と考えられる。

B. 研究方法

当科および関連病院でIFN α -2b + リバビリン療法を受け、追跡調査によりその治療効果が確認されているC-CH63例を対象とした。BMIより肥満群(BMI \geq 25)と非肥満群(BMI<25)に分け、治療効果を検討した。なお、63例中52例では治療前に肝生検を施行しており、肝組織中の脂肪化の程度より脂変化率0、<10%、10-30%、>30%の4段階に分類して治療効果との関連も検討した。

C. 研究結果

1) BMIと肝脂肪変性率との関連

BMIと肝組織中の脂肪変性率とは正の相関関係が認められた。

2) HCV陰性化率

遺伝子型より1b群(45例)とnon-1b群(18例)に分け、さらにそれぞれを肥満分と非肥満群に分けて検討すると、患者背景ではnon1b群で

女性が多い傾向を認めたが、年齢、投与前HVC-RNA量、血清トランスアミナーゼ値、肝組織線維化因子には有意差を認めなかった。HCV陰性化率は1b群(肥満群:28.6%、非肥満群:32.3%)、non 1b群(肥満群:88.9%、非肥満群:44.4%)であり、non 1b群の肥満群で高い結果が得られた。BMI \geq 25の肥満群で比較すると有意にnon 1b群の肥満群でHCV陰性率が高かったが、これにはIFNあるいはリバビリン治療薬の減量・中止例が少なかった事が大きな要因と考えられた。次に、肝脂肪変性率と各群でのHCV陰性率を検討すると、1b群では脂肪変性率と明らかな関連はみられなかった(肝脂肪変性率0:27%、10%以下:20%、10-30%:31%、30%以上:50%)が、non 1b群では脂肪変性率が高度になるに従ってHCV陰性率は低下がみられた(肝脂肪変性率0:67%、10%以下:60%、10-30%:50%、30%以上:0%)。

なお、肥満度に関わらず治療法とHCV陰性率を検討すると、HCV-RNA量が少ないほど、肝線維化の程度が少ないほどHCV陰性率は高率であった。

D. 考察

今回の検討は、対象症例が少なく、また対象症例の背景因子を揃えた検討でないため、IFN療法における肥満

の意義を明確にすることは出来なかったが、non 1b 群では肝脂肪変性率が高い例ほど HCV 著効率は低い傾向が認められたため、今後症例数をさらに追加して、遺伝子型毎に検討する必要があると思われた。

わが国における今後の IFN 療法においては、PEG-IFN を主体に単独またはリバビリンとの併用療法が中心になるものと考えられるが、その際、日本人の体重に見合った IFN およびリバビリン投与量を考慮することも重要であると思われる。そのためには HCV 遺伝子型と BMI および肝脂肪化の程度との関連をさらに明確にしておく必要がある。

E. 結論

IFN 療法の治療効果に肥満の影響が少なからず関係してい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

学会発表

1)阿部弘一、鈴木一幸、他：C型慢性肝炎に対する IFN α -2b+Ribavirin 併用療法の投与量別治療効果の検討. 第 40 回日本肝臓学会総会、2004.6.3 (千葉)

2)熊谷一郎、鈴木一幸、他：HBs 抗原が消失した慢性 HBV 感染における pre-S 領域の経時的解析：無性候性キャリア住民と慢性肝炎の比較検. 第 40 回日本肝臓学会総会、2004.6.3 (千葉)

3)熊谷一郎、阿部弘一、鈴木一幸：岩手県における E 型急性肝炎の実態：その感染経路と重症化に關与する因子の考察. 第 8 回日本肝臓学会大会、2004.10.21 (福岡)

4)阿部弘一、小山富子、鈴木一幸：C 型肝炎ウイルス検診により発見された HCV キャリアの実態と肝癌の頻度-検診後の追跡調査による検討-. 第 8 回日本肝臓学会大会、2004.10.21 (福岡)

5)宮坂昭生、阿部弘一、鈴木一幸：B 型非代償性肝硬変に対するラミブジンの治療効果と限界. 第 8 回日本肝臓学会大会、2004.10.21 (福岡)

6)熊谷一郎、阿部弘一、鈴木一幸：C 型慢性肝炎例に対する各種抗ウイルス療法の評価. 第 35 回日本肝臓学会東部会、2004.12.10 (東京)

7)熊谷一郎、鈴木一幸、他：B 型重症肝炎に対するラミブジン療法の意義. 第 90 回日本消化器病学会総会、2004.4.21 (仙台)

8)宮坂昭生、鈴木一幸、他：HCV 検診における血清ヒアルロン酸測定の意義. 第 90 回日本消化器病学会総会、

2004.4.21 (仙台)

9)熊谷一郎、阿部弘一、鈴木一幸：岩手県における E 型急性肝炎の実態：その感染経路と重症化に關与する因子の考察. 第 46 回日本消化病学会大会、

2004.10.22 (福岡)

10)阿部弘一、小山富子、鈴木一幸：C 型肝炎ウイルス検診より発見された HCV キャリアの実態と肝癌の頻度-検診後の追跡調査による検討-. 第 46 回日本消化病学会大会、2004.10.22

(福岡)

11)宮坂昭生、阿部弘一、鈴木一幸：B 型非代償性肝硬変に対するラミブジンの治療効果と限界. 第 46 回日本消化病学会大会、2004.10.22 (福岡)

H. 論文発表

1) Kato H, Sugauchi F, Ozasa A, Kao T, Tanaka Y, Sakuragawa H, Sata M, Hino K, Onji M, Okanoue T, Tanaka E, Kawara S, Suzuki K, Hige S, Ohno T, Orito E, Ueda R, Mizokami

M: Hepatitis B genotype G in an extremely rare genotype in Japan. *Hepatol Res* 2004; 30:199-203.

2) 阿部弘一、熊谷一郎、葛西幸穂、宮坂昭生、遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸：HBV キャリアからの重症化・劇症化例をいかに対処するか. *臨床医* 2004; 30:1607-1611.

3) 阿部弘一、熊谷一郎、遠藤龍人、滝川康裕、鈴木一幸：B 型肝炎重症化例の治療. *内科* 2004; 3:471-476.

4) 鈴木一幸、阿部弘一、熊谷一郎：HBV 無症候性キャリアの自然経過、予後、死因. *ウイルス性肝炎(下)*、日本臨床、2004; 増刊号 8:227-232.

5) Sato S, Suzuki K, Takikawa Y, Endo R, Omata M: Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan before the substantial introduction of liver transplantation: an analysis of 1309 cases in a 15-year national survey. *Hepatol Res* 2004; 30:155-161.

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

酸化ストレスに対するグリチルリチンおよび強力ネオミノファーゲン C の抑制効果

分担研究者 沖田 極 山口大学医学部消化器病態内科学 教授

研究要旨：本邦において C 型慢性肝炎からの肝発癌抑制効果を実証されたインターフェロン以外の薬剤は強力ネオミノファーゲン C (SNMC) のみである。SNMC はウイルス肝炎の治療薬として広く使用されているが、その薬効に関する作用機序については不明の点が多い。一方、C 型慢性肝炎の病態に酸化ストレスが関与することが明らかにされている。そこで、HCV コア蛋白の発現が調節可能な培養細胞 (*in vitro*) と HCV 全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス (HCV TgM) (*in vivo*) を用いて SNMC が酸化ストレスに及ぼす効果について検討した。コア蛋白発現による活性酸素の上昇を SNMC の主成分であるグリチルリチンは用量依存性に抑制した。また、グリチルリチンはコア蛋白発現の有無に関係なく細胞内のグルタチオン (GSH) 量を上昇させた。HCV TgM の尾静脈より微量の四塩化炭素 (CCl₄) 20 μ l/kg を投与するとコントロールマウスに比べて有意に血清 ALT 値と肝内脂質過酸化二次性生物が上昇したが、SNMC 投与 (50 μ l) はこれらを有意に抑制した。また、SNMC は HCV 蛋白の有無に関係なく、CCl₄ 投与により低下した還元型/酸化型 GSH 比を有意に上昇させた。以上より、C 型慢性肝疾患に対するグリチルリチンの効果として抗酸化作用が重要であると考えられた。

共同研究者

仁科惣治 山口大学医学部消化器病態内科学
古谷隆和 山口大学医学部消化器病態内科学
原 裕一 山口大学医学部消化器病態内科学
坂井田功 山口大学医学部消化器病態内科学 助教授
日野啓輔 山口大学医学部保健学科 助教授

A. 研究目的

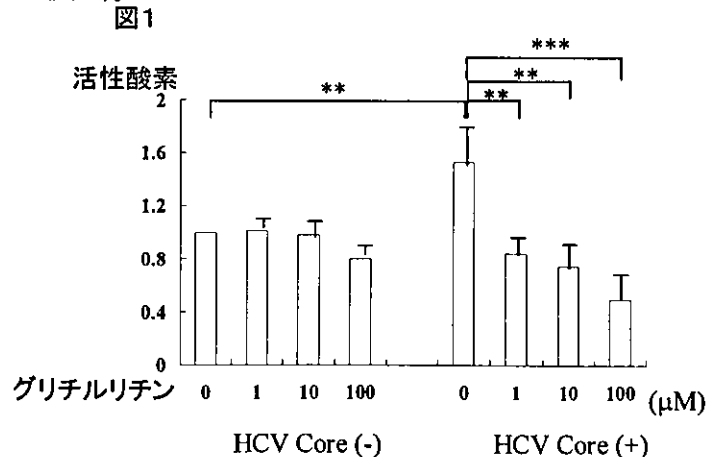
本邦においても難治型の C 型慢性肝炎に対してペグインターフェロンとリバビリン併用療法が可能になりその効果が期待される。しかし、50%弱の症例ではウイルス排除が期待されず、またわが国の C 型慢性肝炎患者は高齢化が進んでいるため強力なインターフェロンとリバビリン併用療法を施行し得ない症例も数多く存在する。ウイルス排除が困難な症例に対してはトランスアミナーゼを安定化させることで肝発癌を抑制しようとする試みがなされている。強力ネオミノファーゲン C (SNMC) は本邦において C 型慢性肝炎からの肝発癌抑制効果を実証されたインターフェロン以外の唯一の薬剤であるが、その薬効に関する作用機序については不明の点が多い。一方、C 型慢性肝炎の病態に酸化ストレスが重要な役割を果たすことが次第に明らかにされてきている。そこで本研究では HCV コア蛋白の発現が調節可能な培養細胞 (*in vitro*) と HCV 全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス (HCV TgM) (*in vivo*) を用いて SNMC が酸化ストレスに及ぼす効果について検討した。

B. 研究方法

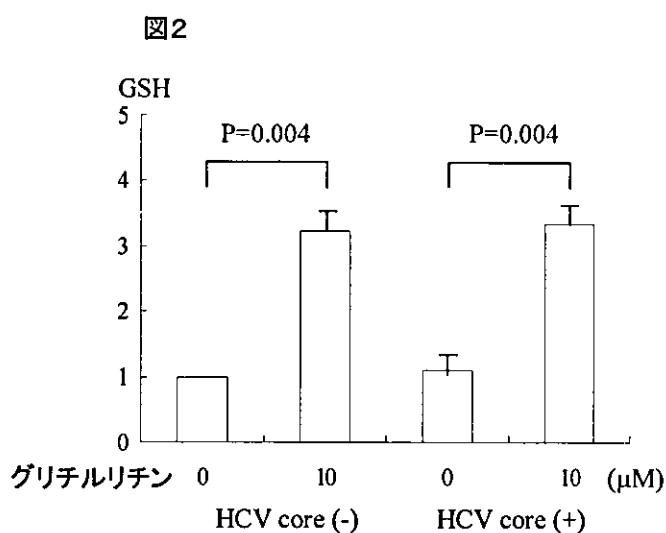
1. Tet-Off システムにより HCV コアタンパクの発現が調節可能な培養細胞 (Huh-7) にグリチルリチンを 1, 10, 100 μ M の濃度で添加し、活性酸素の産生量と細胞内 GSH 量を測定した。
2. HCV 全遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス (HCV TgM) の尾静脈より微量の四塩化炭素 (CCl₄) 20 μ l/kg を投与し、その 1 時間後に SNMC 50 μ l を投与した。CCl₄ 投与後と CCl₄ 投与後に SNMC を投与した時の血清 ALT 値、肝内 malondialdehyde (MDA) 量および肝内還元型/酸化型 GSH (GSH/GSSG) 比を比較検討した。

C. 研究結果

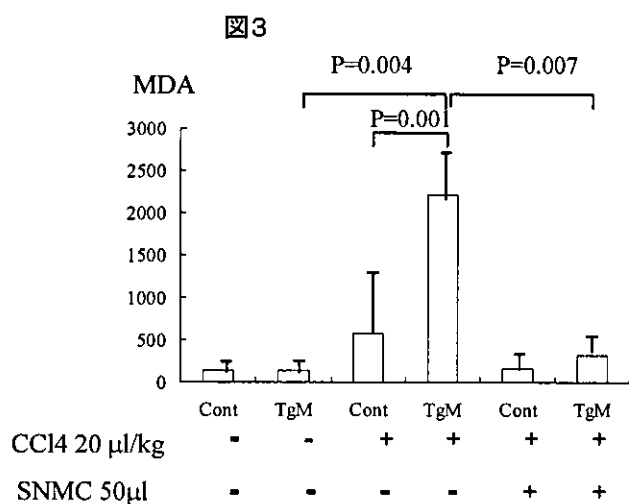
- 1) コア蛋白発現による活性酸素の上昇を SNMC の主成分であるグリチルリチンは用量依存性に抑制した(図 1)。



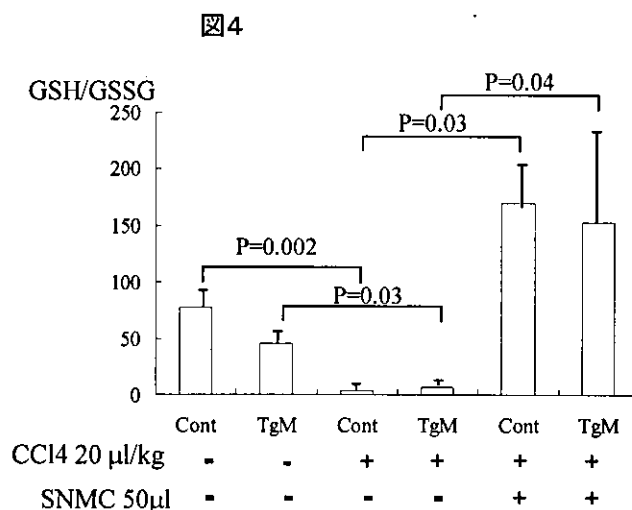
2) グリチルリチンはコア蛋白発現の有無に関係なく細胞内のグルタチオン (GSH) 量を上昇させた(図2)。



3) HCV TgM に微量の四塩化炭素 (CCl₄) 20 μl/kg を投与するとコントロールマウスに比べて有意に血清ALT値と肝内MDA量が上昇したが、SNMC投与(50 μl)はこれらを有意に抑制した (図3)。



4) 肝組織内の GSH/GSSG 比は HCV 蛋白の発現に関係なく僅かな CCl₄ 投与により低下するが、SNMC 投与により回復した (図4)。



D 考察

SNMC は肝障害に対してトランスアミナーゼの下降作用を持つため臨床的には広範な肝疾患に使用されている。今回の検討から SNMC は抗酸化作用を持つことが明らかとなったが、その一つの機序として GSH の上昇が示唆された。HCV 蛋白により誘導された酸化ストレスが SNMC で抑制されることから、C 型慢性肝疾患に対するグリチルリチンの効果として抗酸化作用が重要であると考えられた。今後はグリチルリチンの抗酸化機序を更に詳細に検討し、HCV 感染からの肝発癌に対する抑制効果のメカニズムを明らかにしていく必要があると考えられる。

E 健康危険情報

特記すべきことなし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

血漿アミノ酸分析を応用した肝線維化ステージ診断および IFN 治療効果の評価について

分担研究者 各務 伸一 愛知医科大学消化器内科 教授

研究要旨: 血漿アミノ酸濃度を多変量変数として相関解析を行うことにより非侵襲的に肝線維化ステージを評価する手法を開発した。すなわち血漿アミノ酸濃度を測定後、数種類のアミノ酸を抽出して一定の計算式に当てはめ算出した“AminoIndex (AI)”は、慢性肝疾患における肝線維化ステージの判別において Fischer 比よりもすぐれた診断能を有していることが明らかとなった。また、血漿アミノ酸濃度のバランスを解析することにより IFN 治療の効果予測が可能であるかどうかについての検討を行った結果、IFN 治療開始直前の血中の分岐鎖アミノ酸値 (BCAA) は、IFN 投与終了時におけるウイルス消失群においてウイルス非消失群に比べて有意に高値であったことが明らかとなり、この方法により IFN 治療効果を予測することがある程度可能であると考えられた。これらの結果から、適切なアミノ酸を選択しそれらの動態を詳細に検討することにより目的に即した有用な生体内の情報を得ることが可能であると考えられた。

共同研究者

奥村明彦 愛知医科大学 消化器内科 講師
石川哲也 愛知医科大学 消化器内科 講師

A. 研究目的

肝線維化ステージの診断は肝生検組織の組織診断によりなされている。しかし肝疾患患者においては血液凝固機能の異常や出血傾向などのために肝生検が安全に施行できない場合も存在しており、非侵襲的で有効かつ簡便な診断法の開発が求められている。これまで我々は血漿アミノ酸濃度が肝臓の病態を反映して変動していることを報告してきたが、今回、血漿アミノ酸濃度を多変量変数として相関解析を行うことにより肝線維化ステージを評価する手法を開発したため報告する。また、血漿アミノ酸濃度の動態を解析することにより IFN 治療の効果予測が可能であるかどうかについての検討を行った。

B. 研究方法

56例の C 型慢性肝炎患者および C 型肝硬変患者 (F1:F2:F3:F4=23:5:10:18 例)

を対象として早朝空腹時に採血を行い、23 種類のアミノ酸の血漿中の濃度を測定した。これらのアミノ酸を疾患の進展と正の相関をもった群と負の相関を持った群に分類し、それぞれの群からいくつかのアミノ酸を抽出して一定の計算式に当てはめ、これらの割合を“AminoIndex (AI)”として算出した。このようにして得られた AI により線維化ステージを正確に判別できるかどうかを Fischer 比 (FR) との対比により評価した。また、71 症例の C 型慢性肝炎患者において、IFN 治療開始直前の血漿アミノ酸濃度を測定すると同時に IFN γ 産生 T 細胞数および IL4 産生 T 細胞数をフローサイトメトリーにより測定し、両者の比を Th1/Th2 として算出した。次にこれらの指標と IFN 投与終了時のウイルス消失率との関連性について検討した。

C. 研究結果

F2 以下のステージ群 (軽度線維化群) と F3・F4 群 (高度線維化群) の判別において、まず ROC 曲線解析による比較を行ったところ、AI、FR を用いた場合の AUC (曲線下面積) はそれぞれ 0.925、0.864 であり、AI は

FR よりも高い診断能をもつことが示された。また、相関係数(R^2)についても FR は $R^2=0.396$ であったのに対し AI は $R^2=0.569$ と FR より高い相関を示した。次に、AI、FR をもちいてすべての症例を分別し、実際の線維化ステージの判別と合致しているかどうか(最大判別効率)を検討したところ、FR では 81.5%の症例が正しく分類されたのに対して AI を用いた場合には 87.0%の症例が正しく分類され、AIによる最大判別効率は FR よりも勝っていた。

IFN 治療の効果予測については、IFN 治療開始後には時間の経過と共に Th1/Th2 は有意に低下していることが明らかとなった。また、IFN 投与終了時のウイルス消失率と Th1/Th2 の間には統計学上有意な相関関係が認められなかったのに対し、ウイルスが消失した群においては治療開始直前の分岐鎖アミノ酸値(BCAA)がウイルス非消失群に比べて有意に高値であったことが明らかとなった。

D. 考察

血中アミノ酸のバランスは生体内における免疫状態をはじめとしたさまざまな状態のトータルの output であると考えられ、適切なアミノ酸を選択しそれらの動態を詳細に検討することにより目的に即した有用な生体内の情報を得ることが可能であると考えられる。今回我々が報告した AI のような非侵襲的な肝線維化の診断法は、血液凝固機能の異常や出血傾向などのために肝生検が安全に施行できない場合などには特に意義があることであると考えられる。また、同様に IFN 治療効果についても Th1/Th2 以上の有用な予測指標を算出することが可能であると考えられ、今後はより簡便に利用できる新たなパラメーターを開発してゆく必要があると思われる。

E. 結論

“AminoIndex (AI)”を用いることにより、非侵襲的に慢性肝疾患における肝線維化ステージを判別することが可能であった。また、適切なアミノ酸を選択しそれらの動態を詳細に検討することにより IFN 治療効果についても有用な予測指標を算出することが可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

当該研究に関するものはなし。

2. 学会発表

- (1) 奥村明彦、石川哲也、綾田穰、佐藤頭、前野禎、堀田直樹、多賀谷恒明、福沢嘉孝、各務伸一. 慢性 C 型肝炎患者に対する IFN・リバビリン治療中の血中アミノ酸の変化と Th1/Th2 バランスの解析. 第 11 回日本消化器関連学会週間・第 7 回日本肝臓学会大会. 2003.10 大阪
- (2) Okumura A, Ishikawa T, Ayada M, Sato K, Maeno T, Hotta N, Tagaya T, Fukuzawa Y, Kakumu S. Nutrition is more important than Th1-dominated condition for better response in interferon alpha-2b/ribavirin. The 54th Annual Meeting of American association for the Study of the Liver Diseases 2003.11 Boston

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

申請中。

2. 実用新案登録

なし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型慢性肝炎に対する Interferon・Ribavirin 併用療法時のウイルス学的不応例の検討 —HCV core 領域のアミノ酸配列の検討—

分担研究者 熊田博光 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 副院長

研究要旨：HCV genotype 1b・高ウイルス量症例に対する Interferon(IFN)・Ribavirin(RBV)併用療法中にウイルスが陰性化しないウイルス学的不応例(Non-virological responder (NVR))に寄与する治療前予測因子を多変量解析で検討した。HCV core 領域の aa70 and/or aa91 でアミノ酸置換を有することが統計学的に有意差を示した。また、aa70 は glutamine、aa91 は methionine に置換される傾向があった。特に、治療開始後 24 週間以内に HCV RNA 量が $2\log_{10}$ IU/ml 以上低下しない absolute NVR ではこの様なアミノ酸置換パターンが 90%以上の高頻度で確認された。HCV core 領域のアミノ酸パターンは IFN・RBV 併用療法における NVR の治療前予測因子として有用であった。

共同研究者

芥田憲夫 虎の門病院 消化器科 医員
鈴木文孝 虎の門病院 消化器科 医員

A. 研究目的

HCV genotype 1b・高ウイルス量(>100KIU/ml)症例に対する Interferon(IFN)・Ribavirin(RBV)併用療法中にウイルスが陰性化しないウイルス学的不応例(Non-virological responder (NVR))について検討する。ウイルス学的因子として HCV core 領域のアミノ酸配列(aa1-191)の検討も行う。

B. 研究方法

(検討 1) IFN・RBV 併用療法 48 週間投与

2001 年から 2003 年に IFN・RBV 併用療法 48 週間の study に entry した genotype 1b・高ウイルス量の 57 例の中で 24 週間以上治療可能であった 50 例を対象とした。Peginterferon(PEG-IFN) α 2b 投与群 34 例、IFN α 2b 投与群 16 例。いずれも RBV600-800mg/日を併用。年齢 53 歳(中央値)。男性 31 例：女性 19 例。HCV-RNA 710KIU/ml(中央値)。Body mass index 23.2kg/m²(中央値)。F1/2/3：31/15/4 例。ISDR 変異数 (wild/intermediate/mutant)：27/20/3 例。Hepatocyte steatosis の程度 (< 33%/33-66%/ > 66%)：43/7/0 例。ウイルス学的因子として Core 領域のアミノ酸配列についても検討した。治療中のウイルス陰性化例を virological responder(VR)、非陰性化例を NVR と定義し、ウイルス学的要因も含めた 23 個のパラメーターから NVR に寄与する治療前独立因子を多変量解析で検討した。更に、Core 領域のアミノ酸置換パターンから見た治療成績についても検討した。Core 領域のアミノ酸パターンは 50 例から作成されたコンセンサスシーケンスとの比較で行われた。

(検討 2) Matched case-control study

1999 年から 2004 年までに当院で 24 週間以上の IFN・RBV 併用療法を受けた genotype 1b・高ウイルス量の 167 例の中で、年齢・性別を一致させた NVR44 例(case)と VR22 例(control)を対象として Matched case-control study を行い、Core 領域のアミノ酸配列が治療効果に及ぼす影響について検討した。両群共に

年齢中央値 53 歳、男女比 3：1。また、NVR をウイルス減少量から 2 群に細分化して更に詳細に Core 領域との関係を検討した。治療開始後 24 週間以内に HCV RNA 量(アンプリコア・ハイレンジ法)が $2\log_{10}$ IU/ml 以上低下しない究極の難治例を absolute NVR(ANVR)、 $2\log$ 以上低下する症例を relative NVR(RNVR)と定義した。

(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、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うえ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。

C. 研究結果

(検討 1) IFN・RBV 併用療法 48 週間投与

NVR は 24.0%(12/50 例)、VR は 76.0%(38/50 例)であった。NVR に寄与する治療前独立因子を多変量解析で求めると、血清アルブミンの低値(P=0.004)と Core 領域の aa70(P=0.013)、aa91(P=0.016)にアミノ酸置換を有することで統計学的に有意差を示した(Logistic regression analysis)。更に、Core のアミノ酸置換パターンから治療成績を見ると、aa70 の glutamine(Q) and/or aa91 の methionine(M)のアミノ酸置換を有する症例が VR 例で 42.1%(16/38 例)であるのに対して NVR 例では 91.7%(11/12 例)と高率であり、これは統計学的に有意差を示した(P=0.003；Fisher's exact probability test)。

(検討 2) Matched case-control study

特に、検討 1 で確認された Core 領域のアミノ酸置換に注目して両群を比較した結果、aa70 and/or aa91 にアミノ酸置換を有する症例は VR で 40.9%(9/22 例)であるのに対して NVR では 77.3%(34/44 例)と高率であり、これは統計学的に有意差を示した(P=0.006；Fisher's exact probability test)。

NVR を 2 群に細分化すると、45.5%(20/44 例)が ANVR、54.5%(24/44 例)が RNVR であった。更に、

Core のアミノ酸から治療成績を見ると aa70 and/or aa91 にアミノ酸置換を有する症例は ANVR で 95.0%(19/20 例)、RNVR で 62.5%(15/24 例)、VR で 40.9%(9/22 例)存在した。ANVR は、RNVR(P=0.049) や VR(P<0.001)と比較して高率に aa70 and/or aa91 のアミノ酸置換を有し、統計学的に有意差を示した (Bonferroni test)。aa70 の Q and/or aa91 の M のアミノ酸置換を有する症例は ANVR で 90.0%(18/20 例)、RNVR で 62.5%(15/24 例)、VR で 40.9%(9/22 例)存在した。ANVR は VR と比較して高率であり、統計学的に有意差を示した(P=0.002 ; Bonferroni test)。

D. 考察

IFN・RBV 併用療法は最強の治療である反面、副作用脱落例も多く認める。今回の検討で、HCV genotype 1b・高ウイルス量の RBV 併用療法による NVR 率は 24.0%、中でも究極の難治例といえる ANVR は NVR の 45.5%で存在した。この様なウイルス排除を期待出来ない症例をより早期に判定することは、長期発癌予防を目的とした治療への早期移行を可能とし、患者の身体的・経済的負担をより軽減出来る可能性がある。

NVR の治療前効果予測因子を検討した結果、HCV core 領域の aa70 and/or aa91 でアミノ酸置換を有することが NVR に寄与する独立因子であった。また、aa70 の Q and/or aa91 の M のパターンを有する傾向があり、特に ANVR ではこの様な変化を 90%以上の高い頻度で認めた。IFN 単独療法における治療抵抗性に関しては、HCV core 領域が Jak-STAT signaling cascade を介した抗ウイルス機序に関与していることが報告されている。今回の検討で確認された HCV core 領域のアミノ酸置換パターンが IFN・RBV 併用療法における治療抵抗性にどのようなメカニズムで関与しているか更なる検討を要する。

E. 結論

HCV core 領域のアミノ酸パターンは IFN・RBV 併用療法における NVR の治療前予測因子として有用であった。今後は、より多数例での prospective な検討を必要とする。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Watahiki S, Sato J, Matsuda M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirolgy* 2004 (in press).

2) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Watahiki S, Sato J, Matsuda M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive Factors of non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy in patients infected with hepatitis C virus of genotype1b and high viral load: virological features in core region of non-virological responders. (in submission).

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型慢性肝炎の IFN・リバビリン併用療法時の貧血に対するエイコサペンタエン酸の検討 —多施設共同研究—

分担研究者 佐田通夫 久留米大学第二内科 教授

研究要旨：インターフェロン・リバビリン併用療法（IFN・Rib療法）における最も重要な副作用は貧血である。我々はエイコサペンタエン酸（EPA）が変形能の改善効果をもたらすことに注目し、EPAを投与し、貧血の改善効果を検討した。治療前のHb値が15 g/dl未満例において、EPA投与群では、非投与群に比し0.7～0.9 g/dlの貧血抑制効果を示した。赤血球変形能の検討ではIFN・Rib療法12週目では、治療前に比し、赤血球変形能の有意な低下を認めた。しかしながらEPAを投与した患者に於いては、治療中に於いても赤血球変形能の低下は認められなかった。以上よりEPAは赤血球変形能の改善をもたらし、貧血の改善効果を示すことが判明した。

共同研究者
井出達也 久留米大学第二内科 医員

A 研究目的

インターフェロン・リバビリン併用療法（IFN・Rib療法）における最も重要な副作用は貧血である。貧血の機序のひとつとして、赤血球内に蓄積したりバビリンによりATP濃度が減少し、赤血球変形能の低下が起こり網内系で破壊されるためとされる。我々はエイコサペンタエン酸（EPA）が変形能の改善効果をもたらすことに注目し、EPAを投与し、ヘモグロビン（Hb）値の上昇が認められることを報告した。今回はEPA投与のprospective randomized control trialを行いその効果を検証したので報告する。また赤血球変形能を測定したのであわせて報告する。

B 研究方法

当科および関連病院において、IFN・Rib療法を受けた62例である。治療前に同意を得た後、封筒法にてEPA投与法を決定した。前期投与群は最初の12週間、EPAを投与し、その後中止とした。後期投与群は最初の12週間は、EPAは投与せず、12週治療後に貧血（Hbが正常値以下）が存在する例にEPAを投与した。

赤血球変形能の測定法は、末梢血をクリーンベン

チ内にて、無菌的にHEPES-Naバッファーにて洗浄した。白血球を含まない、赤血球浮遊液を迅速に調整した。Nickel mesh filterを用いた連続負圧式細胞変形能測定装置にて、赤血球変形能を測定した。

C 研究結果

図1にIFN・Rib療法治療開始後12週目までのHb値の減少量を示す。治療前のHb値が15 g/dl未満例において、EPA投与群では、非投与群に比し0.7～0.9 g/dlの貧血抑制効果を示した。図2にIFN・Rib療法およびEPAの投与完遂例のHb値の推移を示す。症例数が少ないため統計学的検討が行えないが、前期投与群、後期投与群いずれもEPA投与例において貧血抑制効果が認められた。

図3に、赤血球変形能の測定結果を示す。C型慢性肝炎患者では、健常人に比し赤血球変形能は有意に低値を示した。IFN・Rib療法12週目では、治療前に比し、赤血球変形能の有意な低下を認めた。しかしながらEPAを投与した患者に於いては、治療中に於いても赤血球変形能の低下は認められなかった。またIFN・Rib療法12週目において、EPA投与例と非投与例を比較するとEPA非投与例が有意に赤血球変形能が低値であった。

図1 前期群と後期群のHb値減少量(12Wまで)

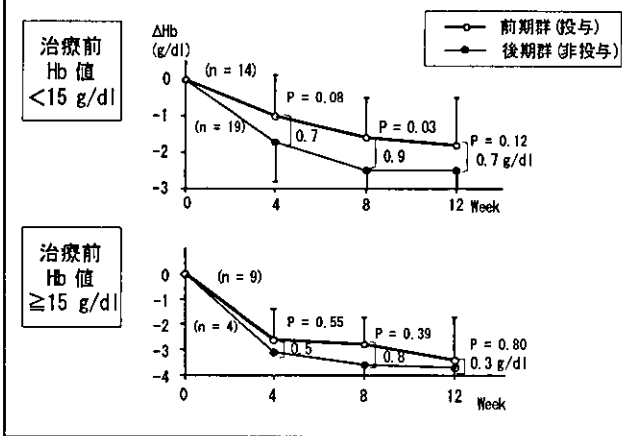


図2 前期群と後期群のHb値減少量

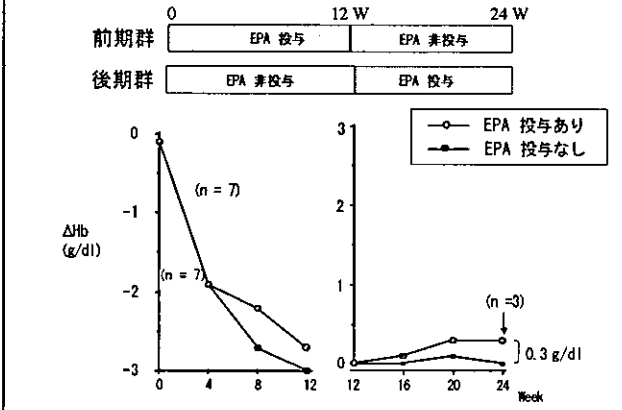
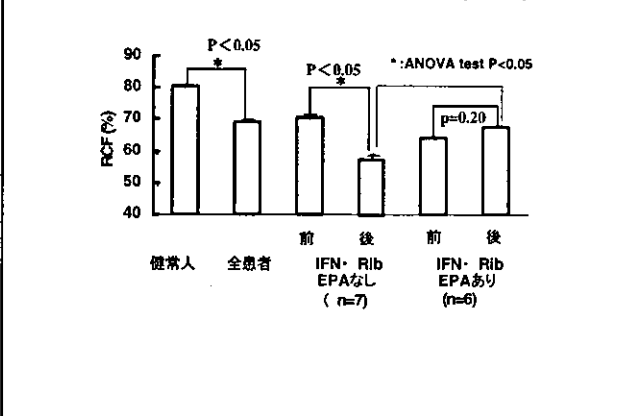


図3 IFN・Rib治療前後での赤血球変形能(RCF)の変化



D. 考察

今回の研究によって、EPA 投与は貧血の抑制効果をもたらすことが明らかになった。しかしその抑制効果は 0.7~0.9 g/dl 程度であるため、EPA を内服していても貧血が完全に改善するわけではなく、リバビリンの減量を行わなければならない症例もあった。EPA の貧血抑制効果は赤血球変形能の測定の結果、赤血球変形能の改善に基づくものと考えられた。貧血の原因として、赤血球中のリバビリン濃度が上昇しており ATP の相対的不足がおこり変形能が低下するためと考えられているが、やはり変形能の改善だけでは貧血が完治しないことから変形能以外の原因もあると考えられる。

今後はさらに他の薬剤との併用などにより貧血を改善していく方法を考案する必要があると考えられた。

E. 結論

EPA は赤血球変形能の改善をもたらし、貧血の改善効果を示すことが判明した。今後さらに貧血を予防するための方策について他の薬剤も含め検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ide T, Okamura T, Kumashiro R, Koga Y, Hino T, Hisamochi A, Ogata K, Tanaka K, Kuwahara R, Seki R, Sata M.

A pilot study of eicosapentaenoic acid therapy for ribavirin-related anemia in patients with chronic hepatitis C.

Int J Mol Med. 2003 Jun; 11(6): 729-32

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

インターフェロンとリバビリンによる PKR, IL-8 を介した HCV 発現阻害

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：T7 アデノウイルスベクターおよび T7 持続発現細胞株を用いた C 型肝炎ウイルス(HCV) full-genome 発現系を用いてインターフェロン(IFN), リバビリン(RBV)の HCV に対する抗ウイルス効果を、Protein kinase R (PKR), Interleukin-8 (IL-8)に注目して解析した。IFN 添加により PKR を介した HCV の増殖抑制がみられ、さらに RBV による HCV 蛋白産生抑制、IFN, RBV による IL-8 産生促進作用が観察された。IFN, RBV を同時に添加した場合にも IL-8 産生は亢進した。このことから IL-8 は IFN 阻害物質としてよりもむしろ、HCV 排除を促進する可能性が示唆された。

共同研究者

日浅陽一	愛媛大学医学部第三内科 助手
徳本良雄	愛媛大学医学部大学院医学研究科
道堯浩二郎	愛媛大学医学部光学医療診療部 助教授
堀池典生	愛媛大学医学部第三内科 助教授

A. 研究目的

我々はすでにアデノウイルスベクターを用いて、細胞毒性が少なくより長期間発現可能な HCV 発現系を樹立している。さらに、より細胞毒性の少ない系として、T7 polymerase を持続発現する細胞株を用いて HCV 長期発現系を樹立した(1, 2)。インターフェロン (IFN), リバビリン (RBV) の HCV に対する抗ウイルス効果をこれらの培養系を用いて評価した。IFN induced protein のうち、Protein kinase R (PKR) は IFN の抗ウイルス作用に重要な蛋白として、Interleukin-8 (IL-8) は、IFN の抗ウイルス効果を阻害すると報告されている(3)。IFN, RBV の PKR, IL-8 への影響を明らかにすることを解析の目的とした。

B. 研究方法

感染性を有する HCV の全長クローンから作成された cDNA の 5'側に T7 プロモーターを、3'側にデルタ肝炎ウイルスのリボザイム遺伝子を持つプラスミド (pH77) を作成した。これを CV-1 細胞あるいは Huh7 細胞にトランスフェクションし、さらに T7 ポリメラーゼを発現する組換えアデノウイルス(Ad-T7)を感染させることにより HCV 遺伝子を宿主細胞に発現させた。また、T7 持続発現細胞に pH77 をトランスフェクションすることにより、アデノウイルスベクターを用いず HCV 遺伝子を発現させた。HCV コア蛋白の発現を経時的に ELISA で定量した。HCV positive 鎖および negative 鎖を strand specific real-time RT-PCR(4)で定量した。これらの系を用いて HCV 発現5時間後に IFN, RBV を培養上清中に加え、HCV 増殖抑制効果をみた。さらに PKR の発現量および activity の経過を Western Blotting で、培養上清中の IL-8 を ELISA で、細胞内の PKR, IL-8 mRNA を real-time PCR 法で定量し観察した。

C. 研究成果

HCV を発現させた後、RNA および蛋白を9日間抽出

し、HCV RNA 量、HCV core 蛋白量を経時的に観察した。上清に IFN を添加したところ、全ての細胞株で IFN 添加後 48 時間でコントロールに比し HCV positive 鎖の有意な ($p < 0.05$) 発現低下がみられた。HCV core 蛋白の定量でも IFN による発現量の低下がみられ、特に肝細胞由来の Huh-7, Huh-T7 細胞において顕著であった。

RBV を加えた際の HCV-RNA, HCV core 蛋白量の変化では、HCV positive 鎖は、すべての細胞株において抑制効果はみられず、HCV negative 鎖は、肝細胞由来細胞株でのみ少し低下がみられた。HCV core 蛋白は monkey kidney 由来の CV-1 では変化なかったが、肝細胞由来の Huh-7, Huh-T7 では明らかな発現低下がみられた。

これらの機序について、まず PKR について Western Blotting で検討した。IFN により PKR の強い発現増加がみられた。特に肝細胞由来株で顕著であった。PKR の活性を表す total eIF2- α に占めるリン酸化 eIF2- α の割合は PKR 発現増加とともに増加し、IFN の HCV 増殖抑制機序に PKR の活性化が関与していることが確認された。対照的に RBV については、PKR の発現増加、活性化は培養期間中みられなかった。

IL-8 についての検討では、IFN 添加後、すべての細胞株において IL-8 mRNA は増加し、上清中への IL-8 の産生も増加した。RBV を単独で加えた際の変化では、肝細胞由来株においてのみ IL-8 mRNA の増加がみられた。また上清中の IL-8 も増加傾向であった。IFN に RBV を加えて培養した場合も IL-8 産生は増加しており、いくつかのポイントでは IL-8 産生の相加的増加がみられた。

D. 考察

アデノウイルスベクターあるいは T7 持続発現細胞株による長期間発現の可能な HCV 発現システムを用いて抗ウイルス薬である IFN, RBV の PKR, IL-8 に与える影響を検討した。この系において HCV の増殖は IFN によって誘導された PKR により抑制された。リバビリン(RBV)単独では PKR の発現は誘導されず、HCV copy 数は低下しなかったが HCV 蛋白発現は低下した。一方、IFN の抗ウイルス効果を阻害すると報告されていた IL-8 の mRNA は肝細胞由来の細胞株で IFN, RBV によって誘導され、RBV は IFN との併用により、IL-8 産生をむしろ亢進させた。このことから、IL-8 は全体として IFN 阻害物質としてよりもむしろ、HCV 排除を

促進する可能性が示唆された。今後さらに IL-8 の HCV 排除に対する直接的な影響や、免疫系などを介した間接的な影響について解析をしていく必要がある。

E. 結論

アデノウイルスあるいはT7持続発現細胞株を用いたHCV発現系において、IFNによるPKRを介したHCV増殖抑制作用が確認された。Interleukin-8はIFN阻害物質としてよりむしろ、HCV排除に関与している可能性が示唆され、そのHCV増殖に与える影響についてさらに検討する必要があると思われる。

参考文献

1. Contreras AM, Hiasa Y, He W, Terella A, Schmidt EV, Chung RT; Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol* 76; 8505-8517, 2002.
 2. Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* (in printing).
 3. Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* 75; 6209-6211, 2001.
 4. Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in sera and peripheral blood mononuclear cells of HCV mono-infected and HIV/HCV co-infected persons. *J infect Dis* (in printing).
- F. 健康保険情報 特記すべきことなし。
- G. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* (in printing).
 - 2) Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in sera and peripheral blood mononuclear cells of HCV mono-infected and HIV/HCV co-infected persons. *J infect Dis* (in printing).
2. 学会発表
- 1) 日浅陽一、堀池典生、Chung, Raymond T.、道堯浩二郎、熊木天児、黒瀬清隆、恩地森一. C型肝細胞癌組織中の Protein kinase R (PKR)の発現量の増加とその機能変化の有無. 第40回日本肝臓学会総会(2004.6.3-4 千葉県浦安市)
 - 2) Hiasa Y, Blackard JT, Tokumoto Y, Horiike N, Michitaka K, Kamegaya Y, Schmidt EV, Chung RT, Onji M. Interferon and ribavirin each stimulate hepatocyte interleukin-8 gene expression in a cell-based HCV replication model. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2003.10.29-11.2 Boston, MA, USA)
 - 3) Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral blood compartments of HIV-/HCV+ and HIV+/HCV+ women. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2003.10.29-11.2 Boston, MA, USA)
 - 4) Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Clair JBS, Schmidt EV, Chung RT. HCV subverts interferon signaling by inducing selective degradation of STAT1. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2003.10.29-11.2 Boston, MA, USA)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働省科学研究費肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

PEG-IFN/Ribavirin 併用治療における樹状細胞機能についての研究

分担研究者 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：難治性 C 型慢性肝炎に対する標準的な治療法は PEG-IFN/Ribavirin 併用治療となったが、本治療を持ってしても約半数の症例でウイルス学的著効が得られない。本治療法のウイルス学的効果に関する免疫学的な予後因子を探索的に検討するため、末梢血より分離した単球由来樹状細胞の Th1 誘導能および末梢血樹状細胞分画の数的評価を行った。本治療により治療後 12 週での EVR が得られた症例では、治療前に半数の症例で IFN α と Ribavirin の添加により樹状細胞の Th1 誘導能が亢進した。一方、EVR の得られなかった症例では全例この Th1 誘導能の亢進が得られなかった。末梢血樹状細胞数は PEG-IFN/Ribavirin 併用治療により約 3 分の 1 まで低下したが、EVR が得られた症例では PDC の低下が有意に抑制されていた。

共同研究者：林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科・教授

胞の数および機能を解析し、治療抵抗性の患者群における免疫学的背景を明らかにすることを目的に研究を行った。

A. 研究目的

2004 年 12 月より Genotype 1 型かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者に対して PEG-IFN/Ribavirin 併用治療が認可され、今後本治療法が標準的な治療法として採用され、当面このような状況が続くことになる。しかしながら、本治療法をもってしても約半数の患者がウイルス排除にいたることがない。このような患者の免疫学的な背景を明らかにすることは、本治療法の効果予測あるいは治療抵抗性のメカニズムを解明する上で有用であると考えられる。そこで、本治療法施行前および施行後に樹状細胞

B. 研究方法

2002 年 5 月より実施されている「Genotype 1 かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者を対象とした PegIFN α + Ribavirin の併用投与による臨床薬理試験」に当院およびその関連施設での参加が得られた症例から末梢血を経時的に採取し、治療前に単球由来樹状細胞の機能解析、治療経過中の末梢血樹状細胞の数的変化について検討した。現在経過観察中の症例を多く含んでおり治療終了 24 週後の SVR での評価ができないため、治療開始後 12 週でのウ

イルスの排除 (EVR) をもとにウイルス排除および非排除を判定した。

末梢血単核球分画より単球を分離し GM-CSF+IL-4 の7日間刺激により樹状細胞を分化誘導した。この誘導の過程で IFN α (100 U/ml) および Ribavirin (1 μ g/ml) を添加し、両薬剤に対する反応性を評価した。得られた樹状細胞の分化度を CD86 の発現で評価し、CD40 リガンドに対する反応性を IL-12、IL-10 の産生量で評価した。樹状細胞の Th1 および Th2 誘導能については樹状細胞と allogeneic donor より得た CD4 陽性 T 細胞とを混合培養し、7日後に CD4 陽性細胞の IFN γ および IL-4 産生を FACS にて解析した。末梢血中の樹状細胞の分画は Lineage 陰性かつ HLA-DR 陽性細胞を樹状細胞とし、CD123 と CD11c で展開することにより MDC (CD123^{low} CD11c⁺) と PDC (CD123^{high} CD11c⁻) に分離した。

(倫理面への配慮)

患者および健常者からの血液サンプルの採取にあたっては、インフォームドコンセントの取得後に行った。

C. 研究成果

単球由来樹状細胞の Th1 誘導能を GM-CSF+IL-4 単独刺激群、+IFN α 添加群、+IFN α +Ribavirin 添加群の3群間で比較し、IFN α あるいは IFN α +Ribavirin の添加により 20%以上 Th1 細胞が増加する場合を IR-Th1 誘導性 (+) と判定した。IR-Th1 誘導性 (+) に分類された患者からは全例 EVR が得られたが、IR-Th1 誘導性 (-) の約 60%では EVR が得られなかった。PEG-IFN/Ribavirin 治療により末梢血樹状

細胞数は約 3分の1程度まで減少したが、EVR が得られた患者では PDC の低下が有意に抑制されていた。

D. 考察と結論

本臨床研究は半年後に経過観察期間が終了することになっており、本研究の最終的な解析はそれを待たなければならない。しかしながら、PEG-IFN/Ribavirin 治療で EVR (12W) が得られた患者は約 70%の症例で SVR が期待できることから、治療前に単球由来樹状細胞の IFN α /Ribavirin 反応性を Th1 誘導能で評価することは、治療の反応性をある程度予測する上で参考になる可能性がある。また、樹状細胞、特に PDC の低下を抑制することが SVR 率の向上に資する可能性が示唆された。

E. 研究発表

論文発表

1. Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Ueda K, Takehara T, Hori M, Hayashi N. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J Biol Chem* 279: 11719-11726, 2004.
2. Kaimori A, Kanto T, Limn CK, Komada Y, Oki C, Inoue M, Miyatake H, Itose I, Sakakibara M, Yakushijin T, Takehara T, Matsuura Y, Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324: 74-83, 2004.

3. Hiramatsu N, Kasahara A, Nakanishi F, Toyama T, Tsujii M, Tsuji S, Kanto T, Takehara T, Kato M, Yoshihara H, Naito M, Katayama K, Hijioka T, Hagiwara H, Kubota S, Oshita M, Meren H, Masuzawa M, Haruna Y, Mita E, Suzuki K, Hayashi N. The significance of interferon and ribavirin combination therapy followed by interferon monotherapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *Hepatol Res* 29: 142-147, 2004.
4. Ishida H, Ohkawa K, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Ueda K, Takehara T, Hayashi N. Involvement of p38 signaling pathway in interferon- α -mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 722-727, 2004.
5. Toyama T, Sasaki Y, Horimoto M, Iyoda K, Yakushijin T, Ohkawa K, Takehara T, Kasahara A, Araki T, Hori M, Hayashi N. Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatoma cells. *J Hepatol* 41:637-643, 2004.
6. Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker III EB, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 127: 1189-1197, 2004.
7. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Jinushi M, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Kanto T, Tsuji S, Hori M, Hayashi N. Concanavarin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an anti-tumor effect in murine liver. *Hepatology* 40: 1190-1196, 2004.
8. Nakanishi F, Ohkawa K, Ishida H, Hosui A, Sato A, Hiramatsu N, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Alteration in gene expression profile by full-length hepatitis B virus genome. *Intervirology* (in press).
9. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173: 6072-6081, 2004.
10. Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190: 1919-1926, 2004.

学会発表

1. Tetsuo Takehara, Tomohide Tatsumi, Takahiro Suzuki, Masahisa Jinushi, Takuya Miyagi, Yoshiyuki Kanazawa, Ohkawa Kazuyoshi, Naoki Hiramatsu, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi A mechanism of hepatocyte apoptosis-mediated liver fibrosis: Production of TGF β through hepatocyte and macrophage engulfment of apoptotic cells. (Oral; #223) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
 2. Takuya Miyagi, Tetsuo Takehara, Tomohide Tatsumi, Takahiro Suzuki, Masahisa Jinushi, Yoshiyuki Kanazawa, Naoki Hiramatsu, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi. Concanavarin A injection activates liver innate immune cells, NKT cells and NK cells, to provoke an anti-tumor effect in murine liver. (Poster; #1233) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
 3. Masahisa Jinushi, Tetsuo Takehara, Tomohide Tasumi, Tatsuya Kanto, Takuya Miyagi, Takahiro Suzuki, Norio hayashi. The critical role of NKG2A inhibitory receptor for NK cell-induced dendritic cell modulation of T cell responses in chronic hepatitis C virus infection. (Poster; #644) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
 4. Hiramatsu N, Kasahara A, Yamaguchi S, Ishii S, Miyazaki M, Toyama T, Yasumaru M, Kanto T, Takehara T, Hayashi N. Necessity of early re-treatment for patients with chronic hepatitis C who do not achieve sustained response by interferon monotherapy. (Poster; #383) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
 5. Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Housui A, Jinushi M, Tatsumi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Involvement of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA in sustained HBV replication in immunocompromised mice after hydrodynamic injection of a naked plasmid encoding HBV DNA. (Oral; #281) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
- F. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得：なし
 2. 実用新案登録：なし
 3. その他：なし