

図2 PEG-IFN治療再燃例に対するTIRTによってSVRとなった53歳女性, セログループ1

IFN $\alpha$ 2a単独投与の難治群に対するSVR率を向上させる目的にもTIRT療法は応用可能であり, 再燃例に対するPEG-IFN $\alpha$ 2a単独あるいは現在治験中のPEG-IFN, リバピリン併用治療を2nd stepに用いることによってSVR率を向上させることができると考えられる。

PEG-IFN $\alpha$ 2a単独治療再燃例に対してTIRTが奏効した1例を呈示する。53歳女性, セログループ1, 2000年8月, HCV-RNA 5.8 Meq/mlの時点よりPEG-IFN $\alpha$ 2a 180  $\mu$ g/週46週投与を行ったが, TRに終わった。投与終了後2カ月目まではHCV-RNA陰性であったが, 3カ月目にHCV-RNA陽性となり, その1カ月後にHCV-RNAは9.2 Meq/mlに上昇, その2週後にALTが315 IUにリバウンドした。その3週間後0.2 Meq/ml未満の状態より2nd stepを開始し, 従来のIFN製剤の単独治療24週投与でSVRとなった。この症例はリバピリン併用例にみられるのと同様に, 1st step終了後長期間のHCV-RNA陰性化の後, 再陽性化が認められた(図2)。

#### 4. リバウンド時におけるサイトカインの動態

IFN投与終了後の血中サイトカインの動態を検討すると, Th1系のIFN $\gamma$ は投与終了時に比し終了1カ月後有意( $p < 0.01$ )に増加し, その後のレベルに復することがわかった。一方, Th2系のサイトカインであるIL-10についてみると, IFN投与終了後いったん減少した後, ALTのリバウンド上昇時に有意( $p < 0.02$ )に増加した。両者の検討よりTh1/Th2はIFN投与終了後いったんTh1側にシフトし, ALTのリバウンド上昇時にTh2優位の状態になると考えられる(図3)。貝沼ら<sup>6</sup>もリバウンド時にCD19+リンパ球数の著明な増加を認め, 液性免疫の賦活化が示唆されるとしている。また, 武井ら<sup>7</sup>はIFN $\alpha$ 投与終了後3カ月目のIFN $\gamma$ とIL-4を測定し, 終了時と比較してIFN $\gamma$ は有意に増加し, IL-4は無効例で有意に低下したと報告している。投与終了後3カ月目はALTのリバウンド後HCV-RNA量が減少する時期にあたり, Th1系へのシフトが2nd stepの有効性の向上に関与しているとも考えられる成績である。

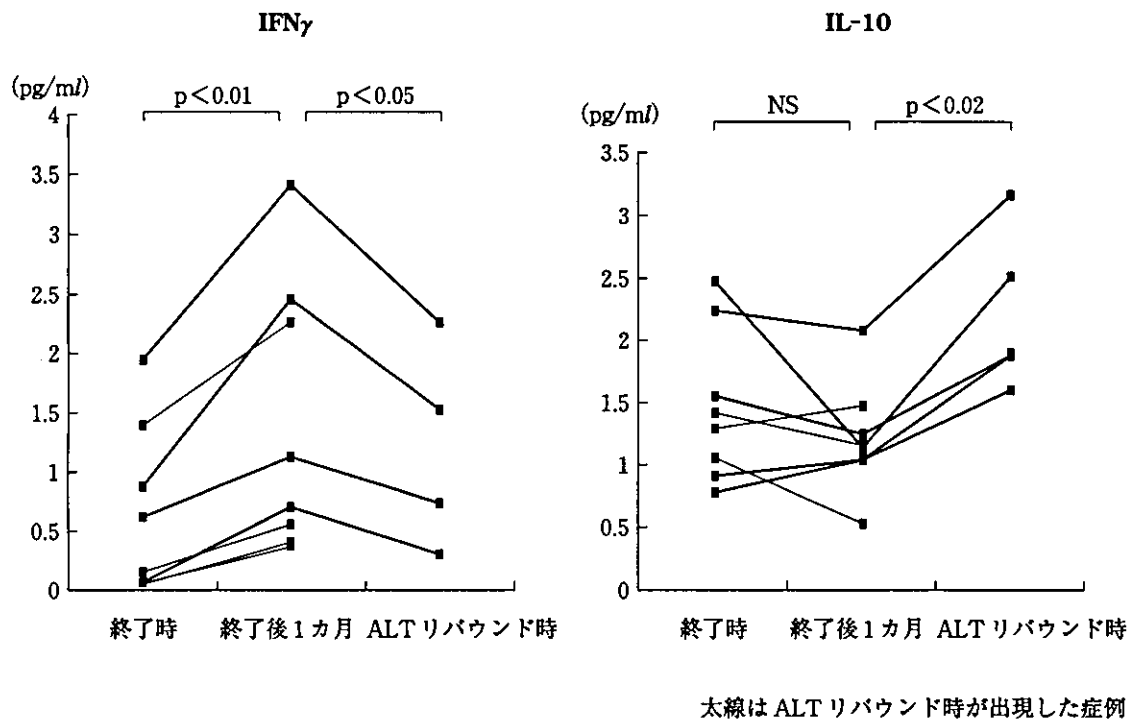


図3 IFN投与終了後の血中Th1およびTh2サイトカインの変動

## 5. TIRT 治療効果向上のためのポイント

### a. 1st step に用いる製剤の選択

1st step に用いる製剤の選択に関しては二通りの考え方がある。一つはその時期に保険診療で使用できる最も SVR 率が高い治療法を用いる方法、他の一つは副作用が軽度で6カ月間確実に治療が持続できる製剤を用いる方法である。前者の利点は1st step で高い SVR 率を得ることができる点であるが、脱落例や2nd step 導入が困難な例も多くなることが予想され、また、1st step 再燃例に2nd step として1st step と同じ治療が保険適用になるかという問題もある。一方、後者では1st step での SVR 率は低い、再燃後の ALT リバウンド発現例ではリバウンド後の HCV-RNA 量低下時より、また ALT リバウンドが発現しない症例でも2nd step として最も SVR 率が高い治療法を用いることができるため、トータルで見ると後者の方が SVR 率が高くなるのではないかと推察している。1st step での脱落例と2nd step 導入が困難な例をできるだけ少なくすることが TIRT 治療効果を向

上させるうえで大きなポイントになると考える。

### b. 1st step 終了後の HCV-RNA 量の経時的測定

1st step 終了後の HCV-RNA 量の経時的測定は通常1カ月1回の間隔でよいが、終了後2カ月を過ぎ ALT 上昇、HCV-RNA 量の低下傾向がみられる時期になると、できるだけ最下降点より2nd step を開始するために HCV-RNA 量の2週や週1回の測定が必要な場合がある。しかし、このような頻回の HCV-RNA 定量(PCR法、プローブ法)は保険適用とならないし、結果が判明するまでに時間がかかりすぎる。TIRT における最も重要で、かつ最も煩雑な作業はこの1st step 終了後の HCV-RNA 量の follow up であるが、HCV-RNA と相関の高い HCV コア抗原検査の開発により頻回のチェックが可能となった。HCV コア抗原は保険点数が低く、測定時間も2時間以内と極めて短時間であるため、外来にてのリアルタイムの follow up が可能となり、HCV-RNA 量の低値を確認後速やかに2nd step に入ることができると考えられる。

## おわりに

PEG-IFN, リバビリン併用治療の難治群に対するSVR率が極めて高率になることが予測されている。しかし、それでもウイルスの消失しない例も多く、それらの‘超難治群’に対する対策としてTIRTは重要な手段である。PEG-IFN, リバビリン併用治療を1st stepに用い、

再燃例で低ウイルスとなった例にIFN再投与を行うか、侵襲の軽度なIFN製剤を1st stepに用い、HCV-RNA量を低下させた後にPEG-IFN, リバビリン併用治療を2nd stepとして用いることが考えられる。いずれの場合もIFN治療後は常にTIRTを念頭に置いた、慎重な経過観察が必要である。

## ■文 献

- 1) 加藤道夫ほか：難治性C型慢性肝炎に対するtwo-step interferon rebound therapyの有用性について。肝臓 41: 396-402, 2000.
- 2) 加藤道夫, 林 紀夫：難治性C型慢性肝炎に対する再投与プロトコルを組み込んだtwo-step interferon rebound therapy に向けてのインターフェロン治療後のHCV-RNAの変動についての検討。ミレニアム消化器 2000(朝倉 均, 中澤三郎編), p 89-91, 日本消化器病学会, 2001.
- 3) 加藤道夫ほか：難治性C型慢性肝炎に対するtwo-step interferon rebound therapy. 消化器科 36: 303-307, 2003.
- 4) 加藤道夫ほか：投与方法の工夫—two-step interferon rebound therapy. 肝胆膵 43: 897-903, 2001.
- 5) Arase Y, et al: Fluctuation patterns of HCV-RNA serum level in patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol 35: 221-225, 2000.
- 6) 貝沼茂三郎ほか：IFN $\beta$ と麻黄湯の併用によるインターフェロンリバウンド療法を行った1例。肝臓 44(Suppl 3): A579, 2003.
- 7) 武井伸之ほか：C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法におけるヘルパーT細胞サイトカイン産生能の検討。東医大誌 57: 457-464, 1999.

## I. C型肝炎ウイルス(HCV)

### C型慢性肝炎の治療

## C型慢性肝炎に対するIFN再治療の成績とその適応

Efficacy and indication of IFN retreatment for patients with chronic hepatitis C

伊与田賢也 加藤道夫

**Key words** : C型慢性肝炎, IFN単独再治療, IFN/リバビリン併用再治療, コンセンサスIFN

### はじめに

1992年より, 我が国ではC型慢性肝炎に対して, IFN治療が行われてきたが, 当初, 投与期間は6カ月に限られ, また, 再投与も認められていなかった. 2000年4月にC型慢性肝炎に対するIFN再投与が認可され, 続いて2001年12月には我が国においてもIFNとリバビリンの24週併用療法が認可された. これによって, IFN単独療法で無効または再燃であった患者に新たな再治療の道が開かれた. では, 実際の再治療の効果やその適応はどうかについて, 本稿では述べたい.

### 1. IFN単独再治療の成績

リバビリンの使用が開始されるまでは, 初回, IFN単独治療無効もしくは, 再燃例(初回IFN治療中に血清ALT値が正常化もしくはHCV-RNAが陰性化後, 再燃した症例)に対して, IFN単独再治療を行っていた. 主なIFN単独再治療についての報告を表1にまとめた.

当院で2001年までにIFN単独再治療を行った75例の治療成績では, 著効率(治療終了24週間におけるHCV-RNA陰性化率)は22例で29%であった. このうち, genotype 1bの高ウイルス量例(1 Meq/ml以上, 100 kcopy/ml以上, 300 fmol/l以上)では著効となった症例はなか

った. 一方, genotype 1bの低ウイルス量例に限ると, 著効率は58%であった. また, これらのうち, IFN再治療の前後で肝生検を施行し得た30例中, activityは8例で, fibrosisは5例で改善していた<sup>1)</sup>. IFN再治療によって, 組織が改善するとの報告は海外でもみられる<sup>2)</sup>. 国立病院・療養所肝疾患ネットワーク参加22施設の2000年から2001年のまとめ<sup>3)</sup>によると, IFN単独再治療例を行った76例のうち, 著効例は26例(34%)であった. このうち, genotype 1bの高ウイルス量例では著効例は1例のみ(4%)であった. 熊田<sup>4)</sup>は初回IFN無効316例に対して, IFN単独再治療を行い著効例は70例(22%)であった. このうち, genotype 1bの高ウイルス量例では著効例は11例(6%)であった. また, 海外からの報告<sup>2,5-7)</sup>をみると, 投与量や投与方法が異なり, 著効率にややばらつきがみられるが, genotype 1以外や低ウイルス量例で著効が認められる. おおむね, 初回時に比べて, IFNの投与期間が長いほど, また投与量が多いほど, 高い著効率が得られている.

以上より, 初回IFN無効または再燃例に対して, 投与時期や期間, 投与量を考慮すれば, IFN再投与により, 著効となる症例が少なからず存在することが考えられる. 一方で, genotype 1bの高ウイルス量例ではIFN単独で著効を得ることは極めて困難である. そこで, 高

Kenya Iyoda, Michio Kato: Department of Gastroenterology, Osaka National Hospital 国立病院大阪医療センター消化器科

表1 IFN単独再治療の著効率

	genotype 1b かつ 高ウイルス量	genotype 1b かつ 高ウイルス量以外	全 例
国内 加藤ら(自験例)	0/ 30( 0%)	22/ 45(49%)	22/ 75(29%)
八橋 <sup>9)</sup>	1/ 26( 4%)	25/ 50(50%)	26/ 76(34%)
熊田 <sup>10)</sup>	11/188( 6%)	59/128(46%)	70/316(22%)
海外 Davisら <sup>5)</sup>	0/ 70( 0%)	8/102( 8%)	8/172( 5%)
Cammaら <sup>6)</sup>	30/224(13%)*	35/158(22%)	73/494(15%)**
Payenら <sup>2)</sup>	6/ 83( 7%)*	28/ 81(35%)	41/190(22%)**
Chemelloら <sup>7)</sup>	5/ 61( 8%)*	8/ 31(26%)	13/ 92(14%)

\*低ウイルス量例も含む genotype 1 全例

\*\*ウイルス量および genotype 未測定症例を含む

表2 IFN/リバビリン併用再治療の著効率

	genotype 1b かつ 高ウイルス量	genotype 1b かつ 高ウイルス量以外	全 例
国内 加藤ら(自験例)	5/ 30(17%)	11/ 13(85%)	16/ 43(37%)
八橋 <sup>9)</sup>	22/108(20%)	24/ 35(69%)	46/143(32%)
豊田 <sup>11)</sup>	6/ 41(15%)	16/ 21(76%)	22/ 62(35%)
海外 Davisら <sup>5)</sup>	18/ 73(25%)	66/100(66%)	84/173(49%)
Saraccoら <sup>8)</sup>	64/427(15%)*	43/167(26%)	107/594(18%)
Di Bisceglieら <sup>9)</sup>	16/ 93(17%)*	14/ 23(61%)	38/124(31%)
Cammaら <sup>10)</sup>	43/297(14%)	45/262(17%)	88/559(16%)

\*genotype 4 も含む

ウイルス量例に対する IFN 再投与方法として、two-step interferon rebound therapy が考案された。これは、IFN 初回投与終了後に、HCV-RNA が再上昇した後、急低下した時点を狙って、IFN を再投与する方法である。詳細は本誌、加藤の稿を参照いただきたい。

## 2. IFN/リバビリン併用再治療の成績

リバビリンが使用できるようになって以降、IFN/リバビリン併用療法が再治療の主流となっている。主な初回 IFN 再燃または無効例に対する IFN/リバビリン併用再治療についての報告を表2にまとめた。当院において今まで IFN/リバビリン併用療法を行った全55例のうち、再投与症例は43例であった。著効例は16例(37%)であった。更に genotype 1b の高ウイルス量例30例に限ると著効例は5例(17%)であった。国立病院・療養所肝疾患ネットワークにおいて、初回 IFN 治療後に IFN/リバビリン併用療法を再治療として行った症例は143例であ

った<sup>9)</sup>。このうち、著効例は46例(32%)であった。更に genotype 1b の高ウイルス量例108例に限ると著効例は22例(20%)であった。海外では、投与量や投与期間に差があるため、著効率にもばらつきがあるが、同様の報告がみられる<sup>5,8-10)</sup>。Saraccoら<sup>8)</sup>によると、IFN 3MU+ribavirin 1,000mg/d の6カ月投与群と IFN 5MU+ribavirin 1,000mg/d の12カ月投与群では著効率が11%と23%で有意差を認めており、IFN 投与量を多く、ribavirin 投与期間を長くすることで再投与治療の著効率を高めることが示された。

更に、IFN 単独群との比較も行われている。1998年から2000年にかけて、国内11施設で行われた多施設二重盲検試験<sup>11)</sup>において、IFN 初回再燃または無効例に対する IFN 再投与の著効率は IFN 単独群では9%であったが、IFN/リバビリン併用群では35%であった。genotype 1b の高ウイルス量例に限ると、著効率は IFN 単独群では0%であったが、IFN/リバビリン併用群

では15%であった。Davisら<sup>9)</sup>は345例の初回IFN再燃例を対象として、IFN $\alpha$ -2b 3MU週3回24週投与単独群とリバビリン併用群に分けて比較検討を行った。著効率は単独群では5%であったが、併用群では49%であった。更にgenotype 1bの高ウイルス量例143例に限った検討でも、著効率は単独群では0%、併用群では25%であった。

また、再治療後の再燃率(治療終了時点でHCV-RNAが陰性化した症例のうち、治療後24週以内に再陽性化した症例の割合)についても幾つか報告がみられる。我が国における再投与症例に対するIFN単独療法とIFN/リバビリン併用療法の24週投与での比較試験において、genotype 1bの高ウイルス量例では、IFN単独群では再燃率は95%、IFN/リバビリン併用群では77%であった。それ以外の症例では再燃率は、IFN単独群では68%に対して、IFN/リバビリン併用群では15%で非常に低かった。以上の報告から、IFN再投与にあたっては、リバビリンを併用することで、その有効性は大幅に改善すると考えられた。

### 3. その他のIFN再治療の成績

2001年より我が国でも使用されているコンセンサスIFNもIFN再治療に用いられる。初回IFN再燃、無効例に対して24週または48週コンセンサスIFNを投与したところ、著効率は20%であった<sup>12)</sup>。更にIFN/リバビリン併用療法が無効であった症例に対するコンセンサスIFN投与の報告がある。BarbaroらはIFN/リバビリン併用療法が無効であったgenotype 1bの高ウイルス量例24例に対し、著効率は33%であった<sup>13)</sup>。IFN/リバビリン併用療法が無効であった症例にコンセンサスIFN治療の有効性が示唆されている。

今後は、ポリエチレングリコールを付加し、持続的に吸収されるようにすることで、血中濃度を維持し、週1回投与が可能となったPeg-IFNの使用が我が国でも可能となる。Peg-IFNとリバビリンを併用した場合のIFN再投与に関する著効率は無効例で34-40%、再燃例で約

60%といわれている<sup>14)</sup>。今後、我が国でもIFN再治療の選択肢の一つとなることが予想される。

### 4. IFN再治療の適応

初回IFN治療無効、再燃例に対しては、原則的に全例、IFN再治療の適応があると考えられる。再治療の方法には、現在のところ、大きく分けてIFN単独とIFN/リバビリン併用療法の2つがある。IFN単独再治療では、初回再燃例で、genotype 1b以外、かつ低ウイルス量であれば、著効例も認める。

熊田らがまとめた2003年度版のC型慢性肝炎の治療ガイドラインによれば、genotypeとウイルス量によって、その標準的治療を決めている。すなわち、再治療でも治癒の難しいgenotype 1bで高ウイルス量例では、IFN $\alpha$ -2bとリバビリンの併用療法24週投与か、あるいは最大2年までのIFN長期投与となっている。一方、難治例以外の全例(genotype 2a, 2b全例と1bの低ウイルス量例)では、以下の3つの方法から選択する。一つはIFN $\alpha$ -2bとリバビリンの併用療法24週投与、二つめはコンセンサスIFNの24週投与、または従来IFN単独の24-48週投与である。原則として、1回目と2回目の治療で同じ方法を行うのは望ましくないとしている。

一方、平松ら<sup>15)</sup>は初回、IFN単独治療でウイルス学的著効が得られなかった症例では全例IFN/リバビリンの併用治療をすべきで、かつ48週の長期投与が望ましいとしている。しかし、現在の保険診療ではIFN/リバビリンの併用は24週しか認められておらず、今後の課題と思われる。また、リバビリンは溶血性貧血や脳出血など、IFN単独治療ではみられなかった副作用も認めることから、症例ごとの慎重な検討が必要と思われる。

以上、まとめると、現在可能なIFN再治療としては、①IFN単独長期(1年以上)投与、②コンセンサスIFN投与、③IFN/リバビリン併用療法の24週投与、④IFN/リバビリン併用療法の24週投与後IFN単独長期投与の4つが考えられる。しかし、初回IFN治療の効果(再燃、

無効)などを考えて、適当な治療法を選択すべきである。実際には、(1)初回 IFN 治療再燃例で genotype 2b かつ低ウイルス量例、および(2)リバビリンの副作用が問題となる症例、以外は IFN/リバビリン併用治療を選択するのがよいと考える。

### おわりに

我が国における C 型慢性肝炎患者の IFN 治療後の再治療としては、現時点では IFN とリバビリンの併用療法が最も著効率が高い。しかし、リバビリンは保険上、24 週しか投与が認めら

れておらず、長期投与への適応が今後の課題である。一方、IFN 単独でも再治療によって著効を得られる症例もある。2003 年 12 月からは Peg-IFN の単独使用が保険適応となり、将来的には、Peg-IFN とリバビリンの併用療法が我が国でも行われるようになると考えられる。IFN 再治療の著効率を上げるためには、個々の症例にあわせた治療法を選択が重要となる。更に今後は、IFN/リバビリン併用療法でも著効を得られない症例に対して、どのような治療を行っていくかも課題である。

### ■文 献

- 1) Iyoda K, et al: Retreatment with interferon for chronic hepatitis C after transient response. *Clin Gastroenterol* 31: 297-301, 2000.
- 2) Payen JL, et al: Better efficacy of a 12-month interferon alfa-2b retreatment in patients with chronic hepatitis C relapsing after a 6-month treatment: a multicenter, controlled, randomized trial. *Le Groupe D' etude et De Traitement du Virus De L' hepatitis C. Hepatology* 28: 1680-1686, 1998.
- 3) 八橋 弘: C 型慢性肝炎 IFN 単独治療および ribavirin 併用治療の治療成績。B 型・C 型肝炎の病態と治療, p160-167, 犬山シンポジウム記録刊行会, 2003.
- 4) 熊田博光: C 型慢性肝炎の IFN 療法 これまでの治療の総括。臨床医 28: 64-65, 2002.
- 5) Davis GL, et al: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. *International Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med* 339: 1493-1499, 1998.
- 6) Camma C, et al: Chronic hepatitis C: interferon retreatment of relapsers. A meta-analysis of individual patient data. *European Concerted Action on Viral Hepatitis. Hepatology* 30: 801-807, 1990.
- 7) Chemello L, et al: Efficacy of a second cycle of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 113: 1654-1659, 1997.
- 8) Saracco G, et al: A randomized 4-arm multicenter study of interferon alfa-2b plus ribavirin in the treatment of patients with chronic hepatitis C not responding to interferon alone. *Hepatology* 34: 133-138, 2001.
- 9) Di Bisceglie AM, et al: Combination of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: re-treatment of nonresponders to interferon. *Hepatology* 33: 704-707, 2001.
- 10) Camma C, et al: Retreatment with interferon plus ribavirin of chronic hepatitis C non-responders to interferon monotherapy: a meta-analysis of individual patient data. *Gut* 51: 864-869, 2002.
- 11) 豊田成司ほか: インターフェロン無効または再燃した C 型慢性肝炎に対するインターフェロン  $\alpha$ -2b と SCH 18908 (リバビリン) の併用投与とインターフェロン  $\alpha$ -2b 単独投与との比較。臨床医薬 18: 539-564, 2002.
- 12) Heathcote EJ, et al: Re-treatment of chronic hepatitis C with consensus interferon. *Hepatology* 27: 1136-1143, 1998.
- 13) Barbaro G, Barbarini G: Consensus interferon for chronic hepatitis C patients with genotype 1 who failed to respond to, or relapsed after, interferon alpha-2b and ribavirin in combination: an Italian pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14: 477-483, 2002.
- 14) Shiffman ML: Retreatment of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 36: S128-134, 2002.
- 15) 平松直樹, 林 紀夫: 慢性肝炎の治療; IFN/リバビリン併用療法 (Peg-IFN まで)。消化器病セミナー 91 6: 111-123, 2003.

## II. B型肝炎ウイルス(HBV)

### HBV関連蛋白

## HBV replication のマーカーとしてのウイルス関連蛋白

HBV-related proteins as a marker of viral replication

結城暢一 加藤道夫

**Key words** : HBe 抗原, Pre-S1 抗原, Pre-S2 抗原, HBe 抗原, HBV ポリメラーゼ

### はじめに

HBV 増殖レベルの評価は、B 型慢性肝炎の活動性を考えるうえで、また、インターフェロンなどの免疫調節剤やラミブジンなどの HBV 逆転写酵素阻害剤を用いた抗ウイルス治療効果を予測・判定するうえで重要である。近年、種々の血中 HBV DNA 定量系が開発され、血中ウイルス量を正確に評価することが容易となったが、本稿では HBV 増殖マーカーとしての臨床的意義が考えられるウイルス関連蛋白について述べる。

#### 1. HBe 抗原蛋白

HBe 抗原は HBV のいわゆる accessory protein の一つであり、ウイルス増殖に必要なものではなく、その詳細な機能は現在においても十分に解明されてはいない。しかし、*in vivo* における HBV 感染の自然経過において HBe 抗原は、病態と密接に関連を示す重要な蛋白である。すなわち、HBe 抗原陽性者ではウイルス増殖レベルは一般に高く、感染性、肝炎活動性や抗ウイルス治療に対する反応性の予測因子として利用されている。このような HBe 抗原と HBV 増殖レベルの関連についての説明としては、HBe 抗原には認めず、分泌型の HBe 抗原のみが有す

る免疫調節機能の関与が想定されている<sup>1)</sup>。

HBV 母児感染において児の慢性化率は HBe 抗原陽性の母を有する児では高く、HBe 抗原陰性の母の場合は低いことや、HBe 抗原非産生性 HBV による感染と劇症肝炎の関連性など多くの臨床的、基礎的データが、tolerogen としての HBe 抗原の機能を示唆している。HBe 抗原陽性期においては、HBe 抗原のこのような作用により、生体が HBV に対し免疫寛容状態に傾くために HBV 増殖レベルは高く、一方、HBe 抗原が低下消失すると HBV 感染肝細胞に対する免疫応答が惹起され、HBV 増殖レベルも低下する可能性が考えられている。

このように臨床的に重要な意義を有する血中 HBe 抗原量は、precore 変異や core promoter 変異のような HBe 抗原産生に影響を与える HBV 変異株の存在比や血中 HBe 抗体価などで変動する。慢性 HBV 感染で HBe 抗原非産生性変異株が出現し、これが優勢になると、通常 HBe 抗原価は低下し、HBV 排除機能が作動する immune clearance 期に入ることが示されている<sup>2)</sup>。また、HBe 抗原陽性者の多くは既に過剰の HBe 抗原と同時に HBe 抗体を有していることが高感度の immune complex assay で示されており<sup>3)</sup>、ウイルス側要因により HBe 抗原産生量が低下すると、抗原と抗体量のバランスにより HBe

Nobukazu Yuki, Michio Kato: Department of Gastroenterology, Osaka National Hospital 国立病院大阪医療センター消化器科



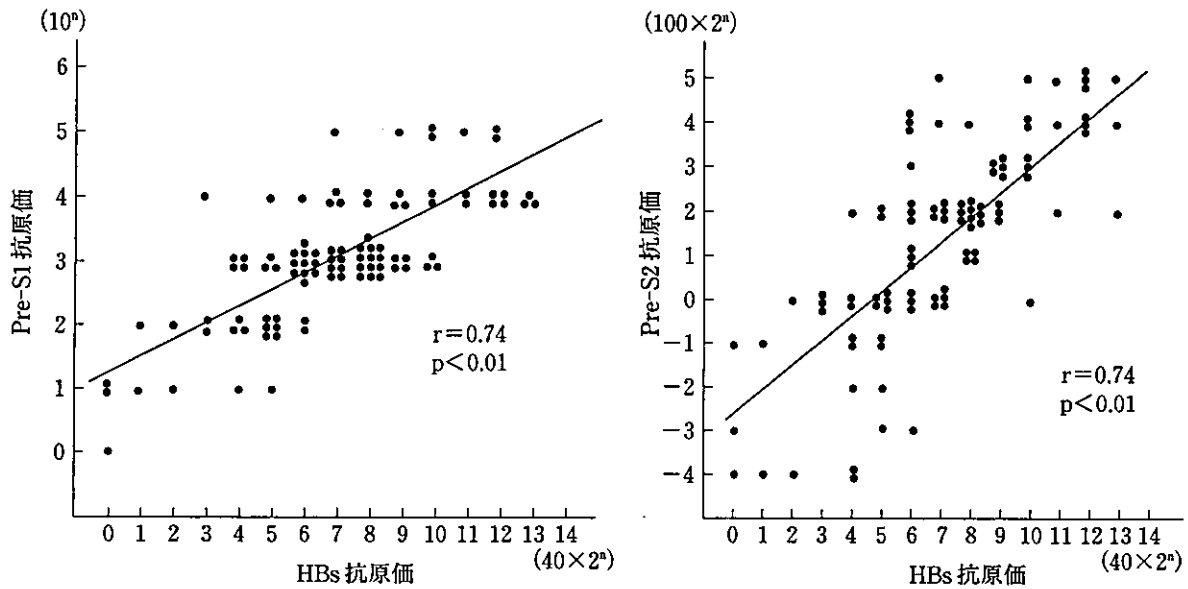


図1 限界希釈法で評価した場合のEIA法におけるPre-S1抗原価およびPre-S2抗原価とreverse passive hemagglutination法におけるHBs抗原価の関係

抗原が陰性化し、HBe抗体が検出されるようになる。HBe抗体陽性期に入るとHBV増殖レベルは一般に低下を示すが、HBVに対する免疫応答の賦活により肝炎の活動性が持続する症例も認める。

## 2. Pre-S1抗原蛋白, Pre-S2抗原蛋白

HBVのenvelopeをコードするopen reading frameは、Pre-S1, Pre-S2およびSの3領域よりなり、3領域すべてを含むlarge surface protein, Pre-S2とS領域を含むmiddle surface proteinおよびS領域のみからなるsmall surface proteinの3種類の蛋白が産生される。一方、HBV感染者の血中には完全なウイルスであるDane粒子とHBVのenvelopeのみで構成され、感染性のない管状粒子および小型球形粒子が存在するが、各粒子によりsurface proteinsの組成は異なる。すなわち、Pre-S1, Pre-S2を含むlarge surface proteinは、Dane粒子および管状粒子に多く含まれるが、小型球形粒子にはほとんど含まれない。また、Pre-S2を含むmiddle surface proteinも、Dane粒子、管状粒子およびe抗原陽性者の小型球形粒子に多く含まれることが知られている。このような事実から、Pre-S1およびPre-S2抗原の検出がウイルス増

殖マーカーとして有用である可能性が提唱された<sup>4,5)</sup>。

しかし、immunoblotting methodによるPre-S1, Pre-S2抗原検出法に比べ、感度、定量性に優れたEIA法やRIA法による血中Pre-S1抗原価およびPre-S2抗原価の定量的評価では、その臨床的意義は乏しいとする報告が多い<sup>6,7)</sup>。EIA法によりPre-S抗原価を定量解析すると、Pre-S1抗原価およびPre-S2抗原価はHBV DNA(Pre-S1 vs HBV DNA,  $r=0.50$ ,  $p<0.01$ ; Pre-S2 vs HBV DNA,  $r=0.46$ ,  $p<0.01$ )およびDNA polymerase活性(Pre-S1 vs polymerase活性,  $r=0.51$ ,  $p<0.01$ ; Pre-S2 vs polymerase活性,  $r=0.59$ ,  $p<0.01$ )と相関は示すが、HBs抗原価と最も良好な相関を認める(Pre-S1 vs HBs抗原,  $r=0.74$ ,  $p<0.01$ ; Pre-S2 vs HBs抗原,  $r=0.74$ ,  $p<0.01$ ) (図1)。

B型急性肝炎の自然経過においてもPre-S抗原価の推移は、HBV DNAやHBV DNA polymerase活性の推移よりもHBs抗原価の推移と一致を認める。更に、Pre-S抗原価をHBs抗原価との比で補正すると、HBe抗原陽性者と陰性者の間で認めるPre-S1およびPre-S2抗原価の差は消失し(表1)、Pre-S抗原価/HBs抗原価の比は、HBV DNA, HBV DNA polymerase活

表1 HBe抗原陽性例と陰性例でのPre-S抗原価およびPre-S抗原価/HBs抗原価の比の比較

	Pre-S1 抗原価 ( $\times 10^3$ )	Pre-S1 抗原価/ HBs 抗原価	Pre-S2 抗原価 ( $\times 10^2$ )	Pre-S2 抗原価/ HBs 抗原価
HBe 抗原陽性者 (n=64)	14.2 $\pm$ 30.6	1.30 $\pm$ 4.57	8.9 $\pm$ 9.7	0.11 $\pm$ 0.17
HBe 抗原陰性者 (n=31)	1.5 $\pm$ 2.9	0.45 $\pm$ 0.55	1.7 $\pm$ 2.0	0.15 $\pm$ 0.26

値は平均 $\pm$ SD

NS: not significant

性のいずれとも相関を示さない。

3種の surface proteins の発現調節メカニズムは十分解明されていないが、これらの知見よりPre-S抗原量は、同じ open reading frame より発現するHBs抗原量と密接に関係し、独自の増殖マーカーとしての臨床的意義は乏しいものと考えられる。

### 3. Core 抗原蛋白と polymerase 蛋白

core 抗原と polymerase は HBV の virion 関連蛋白であり、血中におけるこれらの測定は、

HBV DNA 定量にかわるウイルス増殖マーカーとして有用である可能性が考えられる。HCV 感染ではその core 蛋白の定量が確立され臨床応用されているが、HBV の core 蛋白測定系についても開発が進められている<sup>8)</sup>。また、polymerase については、従来血中における polymerase 活性を測定することで、HBV 増殖レベルの評価がなされてきた。しかし、測定値の信頼性の問題もあり、HBV DNA の定量測定が普及した現在、その測定意義は乏しくなった。

### ■ 文 献

- 1) Milich DR, et al: Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? Proc Natl Acad Sci USA 87: 6599-6603, 1990.
- 2) Chu CM, et al: Precore stop mutant in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B: clinical characteristics and correlation with the course of HBeAg-to-anti-HBe seroconversion. J Clin Microbiol 40: 16-21, 2002.
- 3) Maruyama T, et al: The serology of chronic hepatitis B infection revisited. J Clin Invest 91: 2586-2595, 1993.
- 4) Imai M, et al: A receptor for polymerized human and chimpanzee albumins on hepatitis B virus particles co-occurring with HBeAg. Gastroenterology 76: 242-247, 1979.
- 5) Theilmann L, et al: Detection of Pre-S1 proteins in serum and liver of HBsAg-positive patients: a new marker for hepatitis B virus infection. Hepatology 6: 186-190, 1986.
- 6) Hu P, et al: Quantitative studies of the hepatitis B viral Pre-S proteins: lack of correlation with the HBeAg status. J Virol Methods 16: 97-114, 1987.
- 7) Yuki N, et al: Quantitative analysis of Pre-S1 and Pre-S2 in relation to HBsAg expression. Hepatology 11: 38-43, 1990.
- 8) Rokuhara A, et al: Clinical evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis B virus core-related antigen: a marker distinct from viral DNA for monitoring lamivudine treatment. J Viral Hepat 10: 324-330, 2003.

## Circulating soluble Fas levels in patients with hepatitis C virus infection and interferon therapy

YOSHIMI KAKIUCHI, NOBUKAZU YUKI, KENYA IYODA, YASUNORI SUGIYASU, AKIRA KANEKO, and MICHIO KATO

Department of Gastroenterology, Osaka National Hospital, 2-1-14 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan

**Background.** The clinical relevance of the circulating soluble form of the Fas-Receptor (sFas) was investigated in patients with hepatitis C receiving type 1 interferon (IFN) therapy. **Methods.** sFas was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay in 66 hepatitis C virus (HCV) carriers and 30 HCV-naive or previously infected controls. The levels were then monitored during enhanced treatment with type 1 IFNs in 15 chronic hepatitis C patients. **Results.** The HCV carriers had high levels of sFas compared with controls ( $3.8 \pm 1.3$  vs  $2.7 \pm 0.8$  ng/ml;  $P < 0.001$ ). sFas levels in patients with chronic HCV infection were directly related to serum alanine aminotransferase levels ( $r = 0.440$ ;  $P < 0.001$ ) and the histological grade ( $r = 0.403$ ;  $P = 0.019$ ). Among necroinflammatory reactions, only piecemeal necrosis showed a correlation with sFas levels ( $r = 0.556$ ;  $P = 0.001$ ). Pretreatment sFas levels, however, were not predictive of therapeutic outcomes. A sustained virological response to enhanced IFN therapy showed a relation to only the pretreatment HCV load. Interestingly, circulating sFas was upregulated when IFN- $\beta$  was administered at short intervals (3MU/every 12h). This upregulation was accompanied by parallel aminotransferase elevation, which was observed regardless of a virological response. **Conclusions.** sFas elevation, in parallel with the severity of liver injury, suggests the possible upregulation of hepatic Fas expression and the Fas-mediated pathway in both HCV- and type 1 IFN-induced liver injury. The essential function of sFas to protect hepatocytes against Fas-mediated liver injury was not evident in these clinical settings.

**Key words:** hepatitis C, type 1 interferon, apoptosis, soluble Fas

### Introduction

Fas-Receptor/Fas ligand-mediated apoptosis of liver cells plays a significant role in the pathogenesis of hepatitis C. Hepatic upregulation of Fas was found to be correlated with more severe inflammation caused by ongoing hepatitis C virus (HCV) infection.<sup>1,2</sup> Parallel activation of T lymphocytes expressing Fas ligand was detected in liver-infiltrating mononuclear cells, allowing transduction of the apoptotic death signal to Fas-bearing hepatocytes.<sup>3</sup> Interferon (IFN)- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , members of the type 1 IFN family, are currently used for the treatment of chronic hepatitis C. Hepatic injury in patients treated with systemic administration of type 1 IFNs remains an unresolved problem. A recent study showed that apoptosis may also be involved in type 1 IFN-induced hepatotoxicity.<sup>4</sup>

Fas-Receptor (APO-1/CD95) has a single membrane-spanning domain and is expressed in hepatocytes. An alternatively spliced soluble form of the Fas-Receptor (sFas) without the transmembrane-spanning domain is produced by Fas-expressing hepatocytes,<sup>5,6</sup> and upregulation of Fas expression in hepatocytes contributes to the increase in serum sFas levels. It is of interest that sFas may serve to bind Fas ligand on cytotoxic T lymphocytes, thereby minimizing Fas-mediated liver injury.<sup>7-9</sup> However, the clinical relevance of circulating sFas is not yet fully understood in relation to chronic hepatitis C and type 1 IFN therapy. sFas elevation has been reported in chronic HCV infection,<sup>10</sup> but controversy remains. Possible upregulation of sFas during IFN therapy has also been shown, based on sFas levels within 24h after IFN administration,<sup>11</sup> but the data are limited. To further our understanding of sFas, we studied serum sFas levels in patients with HCV infection as compared with HCV-naive subjects or previously infected controls. sFas levels were then monitored in the course of treatment with type 1 IFNs, and the results were examined in relation to liver injury.

## Patients and methods

### Patients

The subjects were 66 patients with chronic HCV infection (39 men and 27 women; age, 27–80 years [median, 59 years]) and 30 controls without ongoing HCV infection (21 men and 9 women, age 26–73 years [median, 56 years]). No significant difference was seen in sex ( $P = 0.426$ ) or age ( $P = 0.761$ ) distribution between the two groups. The 66 HCV carriers had been persistently positive for serum HCV RNA for more than 6 months. During the entire follow-up, none of the patients displayed any confounding etiology of liver disease, such as hepatitis B virus, autoimmune markers, or alcohol abuse (>25 g/day). Sera were obtained from all patients, and liver biopsy specimens could be obtained from 35 patients at the time of serum collection. After enrollment, 15 of the chronic hepatitis C patients (10 men and 5 women, age 33–63 years [median, 45 years]) were assigned to two different regimens of 4-week enhanced IFN induction therapy. Eight patients (group A) were treated with a high dose of IFN- $\alpha$ 2a (Roferon-A; Nippon Roche, Tokyo, Japan; 9MU/daily for 4 weeks, followed by 9MU/thrice weekly; total dose, 720–1206 MU [median, 941 MU]). The remaining 7 patients (group B) received a high dose of IFN- $\beta$  (Feron; Toray Industries, Tokyo, Japan; 3MU/twice a day for 4 weeks, followed by 6MU/thrice weekly; total dose, 276–636 MU [median, 384 MU]). Using stored serum samples obtained at 0, 1, 2, 4, and 8 weeks after initiation of the induction therapy, we investigated changes in serum alanine aminotransferase (ALT) activity, HCV RNA, and sFas levels.

Sera were also obtained from the 30 control subjects. The controls consisted of 8 healthy individuals without serum HCV RNA and HCV antibody, 8 serum HCV RNA-negative but HCV antibody-positive healthy individuals with no history of IFN therapy, and 14 nonviremic HCV antibody-positive patients who had been successfully treated with IFN therapy for chronic hepatitis C. Patients in the last group had remained negative for serum HCV RNA for 0.7–8.0 years (median, 4.0 years) after the end of previous IFN therapy. All serum samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  without thawing until use. The study was approved by the local Research Ethics Committee, in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki, and all the patients provided written informed consent.

### Laboratory testing

HCV antibody was tested with a third-generation enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ortho Diagnostic Systems, Tokyo, Japan). Serum HCV RNA

was detected by a polymerase chain reaction assay (Amplicor HCV Monitor; Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) and quantified using a branched DNA (bDNA) assay (Quantiplex HCV-RNA; Chiron, Emeryville, CA, USA). HCV RNA-positive serum samples were subjected to HCV genotyping with the genotype-specific NS4 antibody assay (Immucheck-HCV Gr; International Reagent, Kobe, Japan), which is based on a comparison between antibody responses to the two genotype-specific NS4 antigens (C14-1 and C14-2).

### Detection of sFas

Serum sFas levels were measured by ELISA (Medical and Biological Laboratories [MBL], Nagoya, Japan).<sup>12,13</sup> Serum sFas was first captured by polyclonal antibody to an intracellular sequence of human Fas (KDI TSDSEN SFRNEIQSLV), and then detected by monoclonal antibody to an extracellular epitope (KCRCKPNFFC). Thus, the assay is theoretically expected to detect a complete sFas molecule composed of the extracellular and intracellular domains of Fas-Receptor, but is unlikely to detect incomplete cleaved forms of Fas-Receptor, which can be released following the destruction of Fas-expressing cells. In order to quantify the sFas levels, human Fas (GenBank accession no. CAA45250) was expressed in WR19L-12a cells, and standard Fas protein was purified from the membrane fraction. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. In brief, a 96-well plate coated with the polyclonal antibody was incubated with 100  $\mu\text{l}$  of fivefold diluted serum samples and standard Fas protein (0–2 ng/ml) at room temperature for 1 h. After thorough washing, the plate was further incubated with the peroxidase-conjugated monoclonal antibody at room temperature for 1 h. The plate was then washed, and a solution containing tetramethyl benzidine was added. After 30-min incubation, the reaction was stopped, and the optical density at 450 nm was measured. All assays for sFas were done in duplicate, and the concentration of sFas was determined from the standard curve. High levels of sFas were quantified using diluted serum samples.

### Histological evaluation

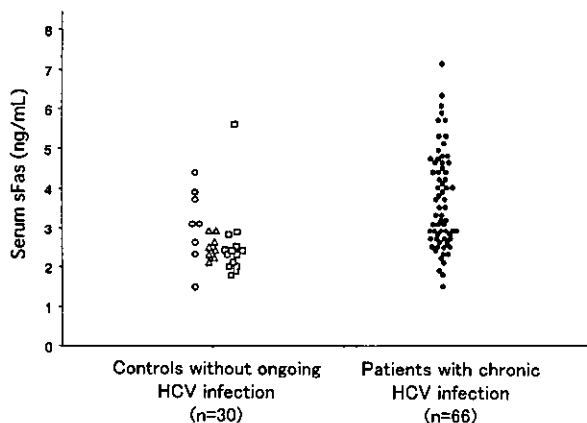
Liver biopsy specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin for routine staining with hematoxylin-eosin. All specimens were examined by the same experienced pathologist, who was unaware of the biochemical, serological, and virological data. Biopsy specimens were semiquantitatively evaluated by the histological activity index described by Knodell et al.<sup>14</sup>

### Statistical analysis

All data values are expressed as means  $\pm$  SD. For numeric variables, group comparisons were performed by the Wilcoxon nonparametric test. The  $\chi^2$  test or Fisher's exact test was used for categorical variables. Correlations between the variables were calculated using Spearman rank order correlations. A value of  $P < 0.05$  (two-tailed) was considered to indicate significance. For multivariate analysis, multiple logistic regression analysis, with a stepwise procedure, was performed with the computer program, SAS 8.02 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

### Results

Figure 1 shows serum sFas levels in relation to the presence of ongoing HCV infection. The 66 chronic HCV carriers had significantly higher levels of sFas ( $3.8 \pm 1.3$  ng/ml) than the 30 controls without ongoing HCV infection ( $2.7 \pm 0.8$  ng/ml;  $P < 0.001$ ). In the control group, remote history of HCV infection exerted no impact on sFas levels. Serum sFas levels were  $2.5 \pm 0.3$  ng/ml for the serum HCV RNA-negative but HCV antibody-positive healthy individuals who were spontaneously cleared of HCV. The levels were compatible

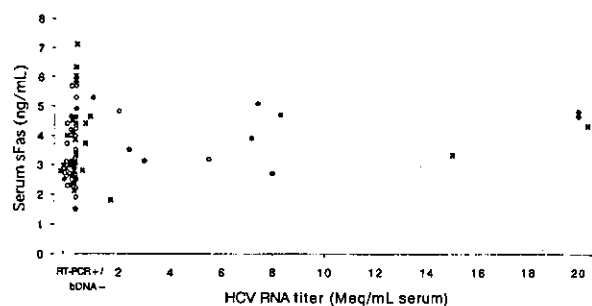


**Fig. 1.** Serum sFas levels in 66 patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection were compared with those in 30 controls without ongoing HCV infection ( $3.8 \pm 1.3$  vs  $2.7 \pm 0.8$  ng/ml;  $P < 0.001$ ). The controls consisted of 8 healthy individuals without serum HCV RNA and HCV antibody (open circles), 8 serum HCV RNA-negative but HCV antibody-positive healthy individuals without interferon (IFN) therapy (open triangles), and 14 patients who had remained negative for serum HCV RNA for 0.7–8.0 years (median, 4.0 years) after the end of IFN therapy for chronic hepatitis C (open squares). The levels of serum soluble Fas-Receptor (sFas) were  $3.1 \pm 0.9$ ,  $2.5 \pm 0.3$ , and  $2.5 \pm 0.9$  ng/ml for these three control groups, respectively, with no significant difference

with those for healthy individuals with no HCV markers ( $3.1 \pm 0.9$  ng/ml). sFas levels were equally low in chronic hepatitis C patients who had been clear of serum HCV RNA for 0.7–8.0 years (median, 4.0) after the end of IFN therapy ( $2.5 \pm 0.9$  ng/ml). No relation of sFas levels with time after IFN therapy was evident in these patients. No correlation was seen between sFas levels and age in the chronic HCV carriers ( $r = 0.007$ ;  $P = 0.954$ ) or the control subjects ( $r = 0.103$ ;  $P = 0.579$ ).

The elevation of circulating sFas levels in chronic HCV infection was investigated in relation to virological, biochemical, and histological characteristics. In the 66 chronic HCV carriers, sFas levels had no relation to HCV replicative levels, assessed by serum HCV RNA titers (Fig. 2). This was also the case when the correlation was analyzed for each HCV genotype. sFas levels were  $3.6 \pm 1.2$  ng/ml for the 19 patients infected with genotype 1,  $3.6 \pm 1.1$  ng/ml for the 22 patients with genotype 2, and  $3.8 \pm 1.4$  ng/ml for the remaining 25 patients with undetermined genotype(s), with no significant differences among the values. On the other hand, a significant correlation was found between serum sFas levels and ALT activity ( $r = 0.440$ ;  $P < 0.001$ ; Fig. 3). In 35 chronic HCV carriers, the circulating sFas levels were also correlated with liver histological findings (Fig. 4). A significant correlation was revealed between sFas levels and the total grading score ( $r = 0.403$ ;  $P = 0.019$ ), whereas no correlation was evident between sFas levels and the staging score ( $r = 0.321$ ;  $P = 0.057$ ). As for correlations with necroinflammatory scores, sFas levels showed a correlation with piecemeal necrosis ( $r = 0.556$ ;  $P = 0.001$ ), but not with lobular necrosis and inflammation ( $r = 0.224$ ;  $P = 0.192$ ) or portal inflammation ( $r = 0.316$ ;  $P = 0.066$ ).

Changes in serum sFas levels during 8 weeks of enhanced induction treatment with type 1 IFNs were



**Fig. 2.** Relation of serum sFas levels with serum HCV RNA titers and HCV genotypes in the 66 patients with chronic HCV infection. Serum sFas levels had no relation to serum HCV RNA titers and HCV genotypes. Solid circles, patients with genotype 1; open circles, patients with genotype 2; crosses, patients with undetermined genotype

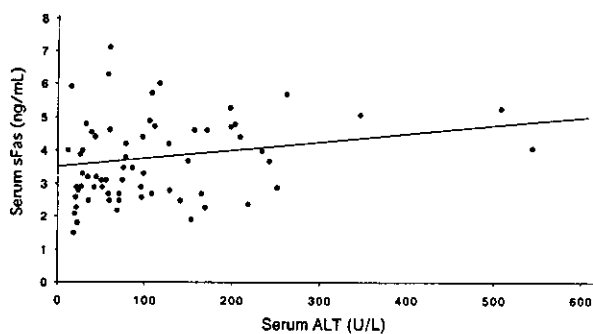


Fig. 3. Relationship between serum sFas levels and serum alanine aminotransferase (ALT) levels in the 66 patients with chronic HCV infection ( $r = 0.440$ ;  $P < 0.001$ )

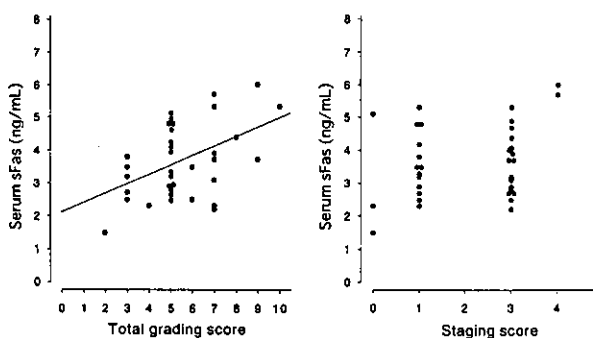


Fig. 4. Relationship between serum sFas levels and histological findings in 35 patients with chronic HCV infection. Serum sFas levels showed a correlation with the total grading score ( $r = 0.403$ ;  $P = 0.019$ ), but not with the staging score ( $r = 0.321$ ;  $P = 0.057$ )

investigated in 15 chronic hepatitis C patients (Fig. 5). The pretreatment viral load ranged from less than 0.5 to 20.0 Meq/ml (median, 3.0 Meq/ml). Genotypes 1 and 2 were found in 9 and 6 patients, respectively. Of the 8 patients treated with IFN- $\alpha$ 2a (group A), serum HCV RNA was cleared during the treatment in 7 patients. In these virological responders, no significant change was seen in serum sFas levels at weeks 1, 2, 4, and 8 as compared with the baseline level ( $3.7 \pm 0.9$  ng/ml). Thus, HCV clearance was not accompanied by a decrease in serum sFas levels. Serum ALT activity was normalized in 4 virological responders, but remained elevated in the other 3. In group B, the 7 patients received enhanced induction treatment with IFN- $\beta$ . A virological response was achieved during the treatment by 6 patients. Despite HCV clearance, the virological responders showed an increase in sFas levels after the initial intensive treatment (3MU/twice a day for 4 weeks;  $4.5 \pm 0.9$  at baseline vs  $7.1 \pm 1.3$  ng/ml at week 4;  $P = 0.018$ ). The levels returned to the baseline after the subsequent treatment (6MU/thrice weekly for 4

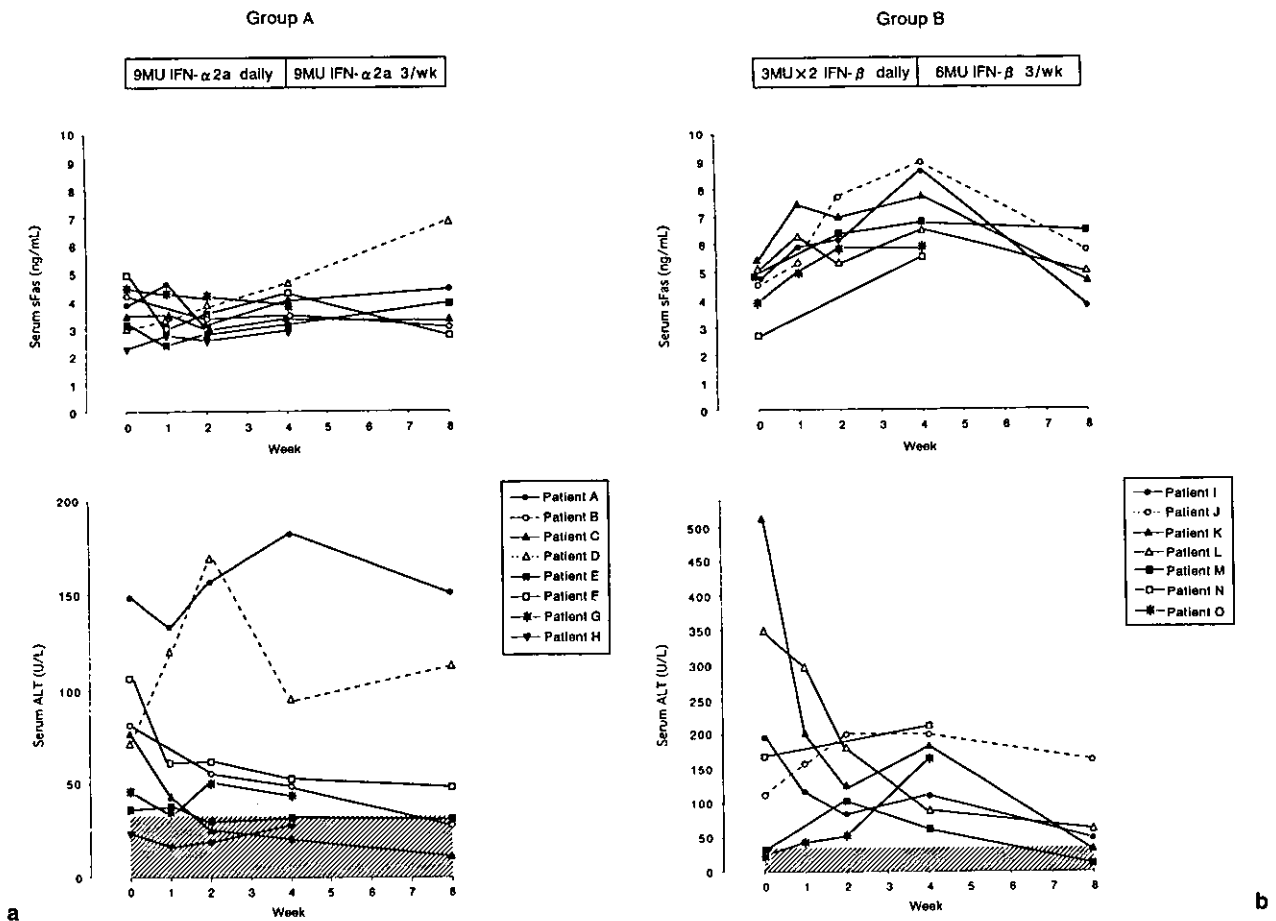
weeks). In parallel with the elevation of sFas levels, serum ALT activity was also elevated in the absence of HCV viremia in 5 of the 6 virological responders.

A sustained virological response, defined as serum HCV RNA clearance at 6 months posttreatment, was achieved by five patients (four patients in group A and one patient in group B). Table 1 shows the clinical and virological characteristics of the sustained virological responders and those of the patients showing no sustained virological response. A significant difference was observed only for the pretreatment viral load. All sustained virological responders had a low pretreatment viral load of less than 0.5 Meq/ml, whereas the levels ranged from less than 0.5 to 20.0 Meq/ml (median, 7.3 Meq/ml) in patients with no sustained virological response ( $P = 0.014$ ). Pretreatment serum sFas levels were the same for patients with a sustained virological response and those without ( $4.5 \pm 0.6$  vs  $3.8 \pm 1.0$  ng/ml;  $P = 0.089$ ). Multivariate analysis also showed only the pretreatment viral load to be predictive of a sustained virological response ( $P = 0.038$ ).

## Discussion

Currently available information suggests that apoptosis-inducing death ligands and corresponding receptors mediate cell death in human liver diseases. Thus, knowledge regarding how this system functions may help in developing rational therapeutic strategies to ameliorate clinical liver diseases. Apoptosis-inducing death receptors belong to the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Fas-Receptor (APO-1/CD95), one of the death receptors, has a single membrane-spanning domain and is expressed in hepatocytes. The particular importance of the Fas-Receptor in chronic hepatitis C has been amply documented.<sup>1,2</sup> Hepatic Fas-Receptor expression has been shown to be upregulated in HCV infection, with a close correlation to the necroinflammatory grade. The Fas-Receptor-mediated apoptotic pathway may also play a significant role in the pathogenesis of other forms of liver injury. An alternatively spliced soluble form of the Fas-Receptor without the transmembrane-spanning domain is produced by Fas-expressing hepatocytes and is considered to serve to bind Fas ligand on cytotoxic T cells, thereby minimizing liver injury.<sup>7-9</sup> However, its clinical relevance has not been well explored.

The present study demonstrated that patients with chronic HCV infection had higher levels of circulating sFas than healthy individuals without previous HCV exposure and patients who had a remote history of HCV infection but had been cleared of HCV spontaneously or following IFN therapy. sFas levels in chronic HCV infection had no relation to HCV replication



**Fig. 5a,b.** Changes in serum sFas and ALT levels during 8 weeks of enhanced IFN therapy for chronic hepatitis C. **a** Eight patients (patients A–H) received 9 megaunits (MU) of IFN- $\alpha$ 2a daily for 4 weeks, followed by the same dose thrice a week for the subsequent 4 weeks (*group A*). **b** The other patients (patients I–O) received 3 MU of IFN- $\beta$  twice a day continuously for 4 weeks, and then 6 MU of IFN- $\beta$  thrice a week for 4 weeks (*group B*). The *Solid* and *dashed lines* in **a** and **b** indicate patients who were negative and positive for serum HCV RNA, respectively, at the end of treatment. In the end-of-treatment virological responders, serum sFas levels showed no significant change during IFN- $\alpha$ 2a therapy in group A, while the levels increased following the initial 4-week intensive IFN- $\beta$  therapy in group B ( $4.5 \pm 0.9$  before treatment vs  $7.1 \pm 1.3$  ng/ml at 4 weeks;  $P = 0.018$ ) and returned to the baseline levels at 8 weeks. Serum sFas elevation at 4 weeks was associated with serum ALT elevation observed during IFN- $\beta$  therapy. *Shaded areas* indicate the normal range of serum ALT activity

and genotypes, but were correlated with biochemical and histological disease activity. Serum sFas levels measured by the assay we used have been shown to correlate with hepatic Fas expression.<sup>10</sup> Hepatic Fas expression in chronic hepatitis C is particularly prominent at the advancing edge of piecemeal necrosis.<sup>1</sup> sFas levels were also correlated with the severity of necro-inflammatory reactions, especially that of piecemeal necrosis. Collectively, the data obtained suggest the upregulation of hepatic Fas expression and the involvement of the Fas-mediated pathway in HCV-related liver injury. In contrast with experimental studies, sFas in our study failed to protect hepatocytes against Fas-

mediated liver injury. This discrepancy may be attributable to the amount of circulating sFas protein. The inhibition of Fas-Receptor-mediated liver injury by sFas has been reported in mice which were given very large amounts of sFas.<sup>8</sup> Serum sFas levels in mice could have been much higher than those observed in humans, and the levels in chronic hepatitis C patients may not be enough to inhibit the apoptosis caused by Fas ligand on cytotoxic T lymphocytes and its soluble form. Further studies are necessary to clarify the impact of sFas on the Fas-mediated pathway in humans. Thus far, elevation of sFas levels in chronic HCV infection has also been reported,<sup>10</sup> but controversy remains.<sup>11</sup> The

**Table 1.** Factors predictive of a sustained virological response to IFN therapy with 4-week enhanced induction treatment for chronic hepatitis C

Characteristics	Sustained response (n = 5)	No sustained response (n = 10)	P
Age (years)	50 ± 12 52 (37–63)	47 ± 9 45 (33–58)	0.540
Sex (M/F)	4/1	6/4	0.600
Serum sFas (ng/ml)	4.5 ± 0.6 4.4 (3.7–5.3)	3.8 ± 1.0 3.7 (2.3–5.1)	0.178
HCV genotype (1/2)	1/4	8/2	0.089
Serum HCV RNA titer (Meq/ml)	<0.5 (<0.5)	7.3 (<0.5 to 20.0)	0.014
Serum ALT (U/l)	177 ± 189 105 (43–508)	108 ± 103 75 (21–345)	0.327
Histological grading score	7.4 ± 2.3 8 (5–10)	5.0 ± 1.5 5 (3–7)	0.072
Histological staging score	2.2 ± 1.1 3 (1–3)	1.7 ± 1.3 1 (0–3)	0.463
Total IFN dose (MU)	863 ± 302 891 (384–1206)	611 ± 271 597 (276–990)	0.111

Values are given as means ± SD and medians (ranges)

different findings may be attributable to differences in the necroinflammatory grade of the study populations and the different sFas assays used.

In the present study, changes in sFas levels following type 1 IFN administration were investigated. IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , members of the type 1 IFN family, are currently used to treat a number of infectious diseases and cancers. A growing number of chronic hepatitis C patients have been treated with type 1 IFNs, but the effectiveness of these agents is often limited due to adverse side effects. The pathophysiological mechanisms have not been well defined. Type 1 IFN-induced hepatotoxicity is one of such adverse effects and causes serum ALT elevation in patients with a virological response. Recently, several studies showed that the antiviral effects were more pronounced in patients treated twice daily with IFN- $\beta$  compared with once-daily dosing, but that IFN-induced liver injury was more common with the twice-daily treatment protocol.<sup>15,16</sup> The present study showed that virological response to high-dose type 1 IFN therapy was not accompanied by a reduction of sFas levels and that serum ALT levels were likely to remain elevated, despite the clearance of circulating HCV RNA. Interestingly, sFas levels in virological responders increased during intravenous twice-daily treatment with IFN- $\beta$ , and the increase was accompanied by an exacerbation of biochemical disease activity.

Acute hepatopathy with elevated serum aminotransferase levels has also been reported in sheep treated with twice-daily administration of IFN tau, a type 1 IFN, and apoptosis was shown to play a critical role in the IFN tau-induced hepatotoxicity.<sup>4</sup> Type 1 IFNs can affect the expression of various genes and induce apoptosis, but the mechanism of the type 1 IFN-induced apoptosis

remains to be explored. Thus far, regulatable expression of the IFN-induced double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, has been shown to trigger apoptosis, possibly through upregulation of the Fas-Receptor.<sup>17,18</sup> The data obtained in our study support this hypothesis. Elevation of sFas levels and serum ALT activity in virological responders to IFN indicates IFN-induced upregulation of hepatic Fas-Receptor expression and its involvement in type 1 IFN-induced hepatotoxicity. Again, we found that sFas exerted no apparent inhibition of Fas-mediated liver injury during IFN therapy, thus raising further questions as to whether the Fas-mediated pathway is controlled by sFas in humans. Recently, it has been reported that upregulation of sFas can be induced in the very early phase of IFN therapy.<sup>11</sup> Further studies are necessary to work out sFas dynamics in more detail during various treatment regimens.

At present, it remains to be worked out whether sFas levels in chronic hepatitis C are relevant to the therapeutic efficacy of IFN. In the present study, the majority of the patients achieved an end-of-treatment virological response after the enhanced IFN treatment, irrespective of the pretreatment patient characteristics. However, a sustained virological response was related to only the pretreatment viral load. Thus, it was shown that pretreatment circulating sFas levels have little impact on the final therapeutic outcome when patients are subjected to enhanced IFN therapy. Finally, it is likely that upregulation of the Fas-mediated pathway also occurs in other types of liver injury and is accompanied by changes in serum sFas levels. More studies are necessary to address this issue and to further our understanding of sFas.



## References

1. Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;19:1354-9.
2. Okazaki M, Hino K, Fujii K, Kobayashi N, Okita K. Hepatic Fas antigen expression before and after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1996;41:2453-8.
3. Mita E, Hayashi N, Iio S, Takehara T, Hijioka T, Kasahara A, et al. Role of Fas ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:468-74.
4. Kim HT, Stoica G, Bazer FW, Ott TL. Interferon tau-induced hepatocyte apoptosis in sheep. *Hepatology* 2000;31:1275-84.
5. Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 1995;154:2706-13.
6. Papoff G, Cascino I, Eramo A, Starace G, Lynch DH, Ruberti G. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *J Immunol* 1996;156:4622-30.
7. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994;263:1759-62.
8. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med* 1997;3:409-13.
9. Krams SM, Fox CK, Beatty PR, Cao S, Villanueva JC, Esquivel CO, et al. Human hepatocytes produce an isoform of Fas that inhibits apoptosis. *Transplantation* 1998;65:713-21.
10. Iio S, Hayashi N, Mita E, Ueda K, Mochizuki K, Hiramatsu N, et al. Serum levels of soluble Fas antigen in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 1998;29:517-23.
11. Yoneyama K, Goto T, Miura K, Mikami K, Ohshima S, Nakane K, et al. The expression of Fas and Fas ligand, and the effects of interferon in chronic liver diseases with hepatitis C virus. *Hepatology* 2002;24:327-37.
12. Seishima M, Takemura M, Saito K, Sano H, Minatoguchi S, Fujiwara H, et al. Highly sensitive ELISA for soluble Fas in serum: increased soluble Fas in the elderly. *Clin Chem* 1996;42:1911-4.
13. Endo S, Inada K, Takakuwa T, Kasai T, Yamada Y, Wakabayashi G, et al. Nitrite/nitrate (NOx) and sFas antigen levels in patients with multiple organ failure. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996;92:253-6.
14. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-5.
15. Shiratori Y, Perelson AS, Weinberger L, Imazeki F, Yokosuka O, Nakata R, et al. Different turnover rate of hepatitis C virus clearance by different treatment regimen using interferon-beta. *J Hepatol* 2000;33:313-22.
16. Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, Noguchi O, Tsuchiya K, Hamano K, et al. A potent antiviral effect on hepatitis C viral dynamics in serum and peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with high-dose daily interferon alfa plus ribavirin and intravenous twice-daily treatment with interferon beta. *Hepatology* 2001;34:377-84.
17. Balachandran S, Kim CN, Yeh WC, Mak TW, Bhalla K, Barber GN. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J* 1998;17:6888-902.
18. Donze O, Dostie J, Sonenberg N. Regulatable expression of the interferon-induced double-stranded RNA dependent protein kinase PKR induces apoptosis and Fas receptor expression. *Virology* 1999;256:322-9.

病診連携における最新ウイルス肝炎の診療

●診断法

**B型肝炎ウイルスマーカーの意味とその選択法、  
これを用いた臨床診断**

原 田 英 治\*<sup>1</sup> 矢 倉 道 泰\*<sup>2</sup> 上 司 裕 史\*<sup>2</sup> 時 田 元\*<sup>2</sup>  
田 中 晃 久\*<sup>2</sup> 福 井 秀 雄\*<sup>2</sup> 多 賀 谷 健\*<sup>2</sup> 亀 井 宏 治\*<sup>2</sup>

Key Words

B型肝炎ウイルス  
B型急性肝炎  
B型慢性肝炎  
HBV  
HBV DNA

\*<sup>1</sup> 独立行政法人国立病院機構東京病院統括診療部  
\*<sup>2</sup> 同・消化器科

はじめに

肝炎ウイルス感染症としてのB型肝炎は、B型肝炎ウイルス(HBV)の急性感染および持続感染としてとらえることができる。その診断は肝機能検査とHBVおよび感染宿主が産生した各種HBV関連抗原・抗体(B型肝炎ウイルスマーカー)の測定によってなされる。HBV遺伝子(HBV DNA)の種々の変異の出現は、ウイルスの増殖能およびHBVに対する宿主の免疫応答に種々の変化をきたし、HBV感染の病態を変化させる。変異を含んだHBV遺伝子の解析、各種HBV関連抗原、抗体の検出により、HBV感染の病態をより正確に把握することができる。

**B型肝炎ウイルスの構造**

B型肝炎ウイルスはHBs抗原という外被(殻)にHBc抗原という芯(core抗原)が包まれた構造をもち、肝内のみで増殖する。core粒子内部にHBV遺伝子(HBV DNA)とDNAポリメラーゼおよび逆転写酵素を含有する。

血液中には、HBc抗原がHBs抗原に覆わ

れた42nmの完全なHBV粒子(発見者の名前をとってDane粒子ともいう)と、それ以外に外被(殻)であるHBs抗原のみが管状粒子および小型球形粒子(直径22nm)となって存在する(図1)。管状および小型球形粒子はHBV DNAを持たず増殖能はなく、感染性はない。

HBV DNAは約3,200塩基対からなる不完全環状二本鎖DNAであり、pre-S/S, pre-core/core(pre-C/C), P, Xのアミノ酸に翻訳可能な4つの遺伝子領域・転写読取枠(open reading frame)が存在する。

**HBVの増殖**

不完全二本鎖のDNAを持つHBVは感染後核内で、DNAポリメラーゼの働きにより完全な二本鎖環状になり閉環する。この閉環二本鎖DNA(ccc DNA)を鋳型にmRNAが合成される。その後、mRNAを鋳型にHBs抗原やHBe抗原などの抗原タンパク質が産生される。それと同時にRNA依存性DNAポリメラーゼの逆転写活性により二本鎖DNAが合成される(図2)。

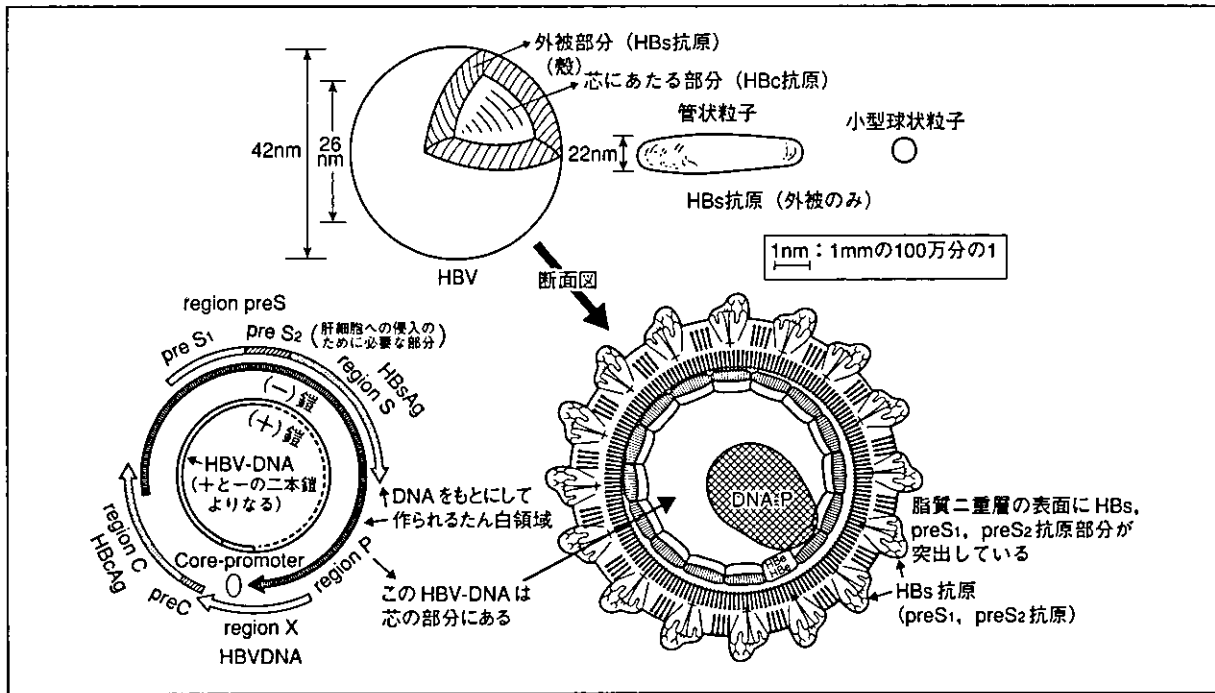


図1 HBV-DNAの構造とたん白コード領域—B型肝炎ウイルスの模型  
(Galibert F:Nature 281:646-650, 1979 を一部改変) (西岡久壽彌によるものを改変)

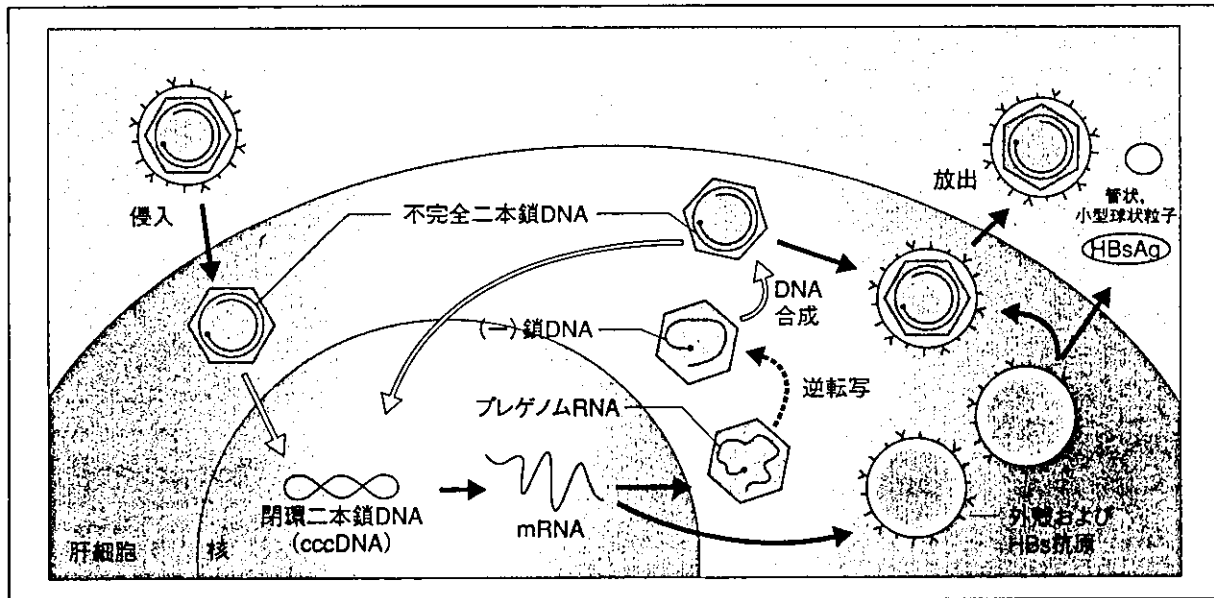


図2 HBVの増殖過程

### B型肝炎ウイルスマーカーとその検出 (表1)

HBV感染の指標 (B型肝炎ウイルスマーカー) として、肝組織内、血液中のHBV DNA、粒子蛋白としてHBc抗原、HBs抗原、

可溶性蛋白としてHBe抗原、さらにHBV関連DNAポリメラーゼ活性がある。血液中のHBc抗原、肝組織中のDNAポリメラーゼ活性は通常の方法では検出されない。さらに、感染個体が免疫応答により産生する各種抗原蛋白に対する抗体が検出される。各種抗原・

表1 B型肝炎ウイルスマーカーの臨床的意義

HBs 抗原	HBV 感染状態
HBs 抗体	
HBc 抗体	過去の HBV 感染, 中和又は感染防禦抗体 過去の HBV 感染 (多くの場合 HBs 抗体陽性)
IgM-HBc 抗体	HBV 感染状態 (ほとんどの場合 HBs 抗原陽性) B 型急性肝炎とその後数カ月, B 型慢性肝炎の急性増悪期
HBc 抗体	血中 HBV 多い (感染性強い) 肝炎例では肝炎の持続性, HBV 増殖のマーカー
HBc 抗体	血中 HBV 少ない (感染性弱い), 肝炎例少ない
HBV 関連 DNA-P	血中 HBV 量を示す, 抗ウイルス効果の指標 HBV 増殖のマーカー
HBV DNA	

(日本消化器病学会肝機能研究班: 肝疾患におけるウイルスマーカーの選択基準 (3版), 日本消化器病学会雑誌 98:206-213, 2001 より引用, 一部改変)

抗体 (HBs 抗原・HBs 抗体, HBc 抗体, HBe 抗原・HBe 抗体) は, 通常免疫血清学的方法により検出される。凝集反応 (PHA 法, RPHA 法, PA 法, HI 法), ラジオイムノアッセイ法 (RIA 法), 酵素抗体法 (EIA 法), 化学発光免疫測定法 (CLIA), 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) などで測定される。

血中 HBV DNA は分子ハイブリダイゼーション法 (Dot-blot または液相ハイブリダイゼーション), 分岐 DNA プローブ法, さらに検出感度を高めるため核酸増幅法と化学発光を利用した HPA (hybridization protection assay) 法を組み合わせた TMA (transcription mediated amplification) 法や PCR 法で検出される。HBV 関連 DNA ポリメラーゼ活性は, 放射性同位元素標識デオキシリボヌクレオチドを基質として DNA 合成反応を行い測定するが, その活性が不安定であることと感度が低いことから HBV DNA に置き換わっている。

### B型肝炎ウイルスマーカーの臨床的意義 (表2)

#### 1. HBs 抗原と HBs 抗体

HBs 抗原は HBV の外被蛋白で, 血液中には HBV 粒子および管状粒子, 小型球形粒子

として存在する。血液中 HBs 抗原が陽性であることは, HBV 感染が現在成立し, その個体の肝組織に HBV が存在していることを示す。B 型急性肝炎, 無症候性 HBV キャリア, B 型慢性肝疾患などである。

HBs 抗体は HBV に対する感染防禦抗体 (中和抗体) である。HBs 抗体陽性は過去に HBV 感染が成立したか, HB ワクチン接種により HBs 抗体が産生されていることを示す。

HBs 抗原と HBs 抗体の共存が認められることがあるが, HBs 抗原とサブタイプの異なる HBs 抗体 (サブタイプ特異抗原決定基に対する抗体) の存在, HBV 変異株 (escape mutant) の出現などが推定される。

#### 2. HBc 抗原と HBe 抗体

HBc 抗原は HBs 抗原で被覆されているので, 通常, 遊離の状態では血液中には存在しないので検出されない。

HBe 抗体は HBc 抗原に対する抗体で, 既往の感染および現在の HBV 感染いずれでも検出される。

IgG 型 HBc 抗体として検出されるが, 抗体価の高低により既往感染か HBV 感染中かの区別が可能である。低抗体価陽性は既往の感染を示し, HBs 抗体も陽性の場合が多い。