

表1 group およびウイルス量によるインターフェロン著効率

ウイルス量	group	
	group 1 genotype 1a, 1b	group 2 genotype 2a, 2b
高 1 Meq/ml (bDNA 法) 以上 100 Kcopy/ml (アンプリコア法) 以上	8.8%	73.4%
低 1 Meq/ml (bDNA 法) 未満 100 Kcopy/ml (アンプリコア法) 未満	52.7%	79.7%
合計	18.3%	77.9%

の炎症細胞浸潤を認める。C型慢性肝炎ではトランスアミナーゼの高値が持続し、組織病理学的に肝細胞の変性・壊死および炎症細胞浸潤に加え、線維増生による門脈域の拡大を認める。線維化の進行により次第に血小板数、血清アルブミン、総コレステロール値は低下する。

● 診断の根拠

C型肝炎の診断方法として、血清中のHCV抗体の検出、HCV蛋白の検出およびHCV核酸の検出の三方法がある(図2)。

1. HCV抗体診断

HCVのコア領域、NS4A領域およびNS5A領域の3つの領域の遺伝子組み換え発現蛋白を抗原エピトープとして用いる第三世代HCV抗体測定が広く行われている。HCV抗体が高力価であれば、ほぼHCVの感染があるが、中力価、低力価の場合、過去のHCV感染の可能性もあり、HCVコア蛋白および核酸診断が必要となる¹⁾。またC型急性肝炎においてもHCV抗体の陽性化には感染後、1~3か月を要するため、この時期にも核酸診断が必要となる。

2. HCV蛋白診断

コア蛋白を測定することにより、短時間で血液中のHCVを直接検出および定量化することが可能である。C型急性肝炎の診断やインターフェロンの治療効果判定にも有用である。しかし陰性であってもHCVの存在を完全には否定できず、この場合、HCV核酸診断が必要となる。

3. HCV核酸診断

核酸診断は定性的測定と定量的測定がある。

1) 定性的測定

RT-PCRを利用したアンプリコアHCV-RNA定性法がある。本法は $10^2 \sim 10^3$ copy/mlの感度を有する。HCV抗体が低力価でアンプリコアHCV-RNA定性が陰性の場合、過去のHCV感染と考えられる。また急性肝炎初期において、HCV抗体やHCVコア蛋白が陰性でもアンプリコアHCV-RNAが陽性であればC型急性肝炎と診断される。

2) 定量的測定

HCV抗体が高力価であれば、アンプリコアHCV-RNAはほとんど陽性であり、HCV-RNAの定量を以下の方法で測定し、ウイルス血症の程度を評価する。

(1) bDNAプローブ法

測定が簡単迅速であり、高ウイルス量での定量性に優れているが、感度は低い。

(2) アンプリコアHCV-RNA定量法

現在保険認可されているHCV-RNA定量系のなかで最も汎用されており、最も高感度である。測定範囲は0.5~850 Kcopy/mlである。

● 臨床経過

C型急性肝炎により多峰性に増減するトランスアミナーゼは次第に安定化、正常化する場合と、半年以上にわたり増減を繰り返す場合がある。前者では、ごく一部にHCVの自然排除、血中のHCV-RNAの陰性化を認め、自然治癒する場合もあるが、ほとんどの場合は血中のHCV-RNAは陽性であり、いわゆる無症候性キャリアとなる。なおA型やB型肝炎と異なり、劇症化することは稀であるが、急性肝炎回復期に強い骨髄抑制を伴う場合がある。一方、半年以上にわたりトランスアミナーゼが増減を繰り返す場合は慢性肝炎へと移行する。いったん慢性化するとC型肝炎は自然治癒することは極めて稀である。C型慢性肝炎は約15~20年の経過で増悪、寛解を繰り返しながら肝硬変に進展し、20~30年で肝細胞癌へと病変が進行する。

● 治療

HCV 排除の目的でインターフェロン療法が広く行われている²⁾。インターフェロンによる治療効果はウイルスの genotype により異なり、group 1 (genotype 1, 2) はインターフェロン抵抗性であり、ウイルス量が高値の場合、その完全著効率(治療終了後 6 か月以上の持続的な血清 GPT の正常化および HCV-RNA の陰性化)は 8.8% と低い(表 1)。

近年 genotype 1b, 高ウイルス群に対し、抗ウイルス活性を示すプリンヌクレオシドアナログであるリバビリンを用いたリバビリン・インターフェロン併用療法³⁾ や新しい遺伝子組み換えインターフェロンであるコンセンサスインターフェロン療法が施行され、その著効率は約 20% に増加している。ウイルスの排除が困難な症例や副作用によりインターフェロンが使用できない症例には抗炎症療法として、強力ネオミノファーゲン® の注射やウルソデオキシコール酸の内服投与が行われている。

インターフェロンの投与⁴⁾ や血清トランスアミナーゼを正常に保つこと⁵⁾ は肝細胞癌の合併を低下させることが報告されており、C 型肝炎患者の診療において重要と思われる。

● 予 後

HCV の感染を受けると 70~80% が HCV キャリアとなる。感染の初期にウイルスが排除されることがあっても、いったん慢性肝炎となると自然経過でウイルスが排除されることは稀である。C 型慢性肝炎は約 15~20 年の経過で増悪、寛解を繰り返しながら肝硬変に進展する。肝硬変となった患者からは年率 6~7% 程度で肝細胞癌が出現する。

文 献

- 1) 吉澤浩司. 医療研究分野からの最新情報 C 型慢性肝炎 検査と治療の現状. 新薬と治療 52: 14-18, 2002
- 2) 脇浩司, 田妻進, 茶山一彰. インターフェロン治療によるウイルス排除のメカニズム. 熊田博光(編): C 型慢性肝炎の治療最前線 最近の治験と治療. メディカルレビュー社, pp 37-43, 2002
- 3) 平松憲, 大石和佳, 茶山一彰: Peg-IFN および Peg-IFN・リバビリン併用療法. 総合臨床 51: 2010-2015, 2002
- 4) Ikeda K, Saitoh S, Kobayashi M, et al: Long-term interferon therapy for 1 year or longer reduces the hepatocellular carcinogenesis rate in patients with liver cirrhosis caused by hepatitis C virus: a pilot study. J Gastroenterol Hepatol 16: 406-415, 2001
- 5) Chayama K: Management of chronic hepatitis C and prevention of hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 37(Suppl 13): 69-73, 2002

C 型肝炎の治療 5

C 型肝炎ウイルス遺伝子からみた インターフェロン治療

今村道雄 茶山一彰

いまむら みちお, ちゃやま かずあき: 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻先進医療開発科学講座 分子病態制御内科学

● はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は RNA ウイルスであり, そのゲノム複製には RNA ポリメラーゼが作用する。多くの DNA ポリメラーゼが proofreading activity (DNA の複製に際して, 間違っただ塩基が組み入れられたときに, それを削り取って修正し, 正しい塩基に直す活性) を有しているのに対して, RNA ポリメラーゼは一般にそのような活性を有していない。このため, RNA ウイルスでは変異が起りやすく, HCV はゲノム全体にわたって多彩な変異がみられる。血液中のウイルスは, 代表的な配列はあるものの, 少しずつ変異のあるウイルスの集団として存在している。このような少しずつ変異があるウイルスの集団を quasispecies と呼んでいる。

C 型慢性肝炎に対するインターフェロン (IFN) 療法でウイルス学的著効 (sustained virus responder: SVR; IFN 治療終了 24 週後, 血中 HCV-RNA 陰性) が得られるのは約 30% 程度にすぎない。IFN 治療の効果は宿主側因子やウイルス側因子によって異なっている。本稿では, HCV の genotype や遺伝子配列など, HCV 遺伝子からみた IFN 治療について述べる。

表 1 HCV genotype 別による IFN の著効率

genotype	1b (n=157)	2a (n=33)	2b (n=34)
IFN 著効率	25%	73%	71%

● HCV genotype と IFN 効果

HCV 遺伝子は, その塩基配列の相同性から分類される。その分布は世界の地域により異なるが, 日本では genotype 1b が約 70%, 2a が約 20%, 2b が約 10% であり¹⁾, 他の種は非常にまれである。IFN 治療の効果は genotype により大きく異なっている。すなわち日本に最も多く存在する genotype 1b では, ウイルス量が多い症例が多く, また同じウイルス量でも IFN が効きにくい症例が多い。これに対して, genotype 2a, 2b は IFN 治療に対する感受性が高い。表 1 に自験例 224 例の HCV genotype 別の IFN 療法による SVR 率を示す。全体では 39% であるが, genotype 別に異なっており, genotype 1b では 25% と IFN 効果は低い。さらに genotype 1b でもウイルス量が高値 (100kIU/mL 以上) の症例では, SVR 率は 19% と最も難治性である。

このように, 同じ C 型肝炎ウイルスでも genotype の違いにより, IFN に対する感受性が異なるということは, ウイルスの遺伝子の配列

が異なるために、IFN 感受性に何らかの違いが生じていると考えられる。

● ウイルスの変異と IFN 感受性

HCV の genotype により、IFN の治療効果が異なることを述べたが、同じ genotype でも症例によって IFN により治癒しやすい症例と、治癒しにくい症例が存在する。Enomoto らは、IFN が有効であった genotype 1b HCV と無効であった genotype 1b HCV の全遺伝子を比較することにより、それらのアミノ酸配列の相異が NS5A 領域の C 末端側に集中しており、NS5A 蛋白の変異が IFN 感受性に関与していることを見出した。さらにこの変異を HCV-J (HCV 遺伝子 1b の基準クローン) と比較すると、IFN 著効例では NS5A 内の領域 aa.2209~2248 に多数のアミノ酸変異を認めたのに対し、IFN 無効例はほとんど変異を認めず、この領域を interferon sensitivity determining region (ISDR) と名付けた^{2,3)}。ISDR の変異数 0 個の wild type ($n=30$) では IFN の著効率は 0% であったのに対し、変異数 1~3 個の intermediate type ($n=38$) では 13%、変異数 4 個以上の mutant type ($n=16$) では 100% と ISDR の変異数が多いほど IFN の感受性が高いという結果であった。その後、われわれもさらに症例数を増やし、genotype 1b HCV における ISDR のアミノ酸変異数と IFN 治療効果を検討したところ、ISDR の変異数が多い症例はウイルス量 (コア蛋白量) が少なく、IFN 治療効果が高いという同様の結果を確認した⁴⁾。

● E2PePHD の変異と IFN 感受性

HCV の E2 領域には IFN 誘導遺伝子の一つである二重鎖 RNA 依存プロテインキナーゼ (PKR) と結合する領域が存在する。PKR は蛋白翻訳に必須な翻訳開始因子 eIF2 α を不活化し、ウイルス蛋白の翻訳を阻害することにより抗ウイルス効果を示すが、この領域は eIF2 α とも相同性を有している。Taylor らはこの領域を PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain (PePHD) と命名し、PePHD 領域が PKR と結

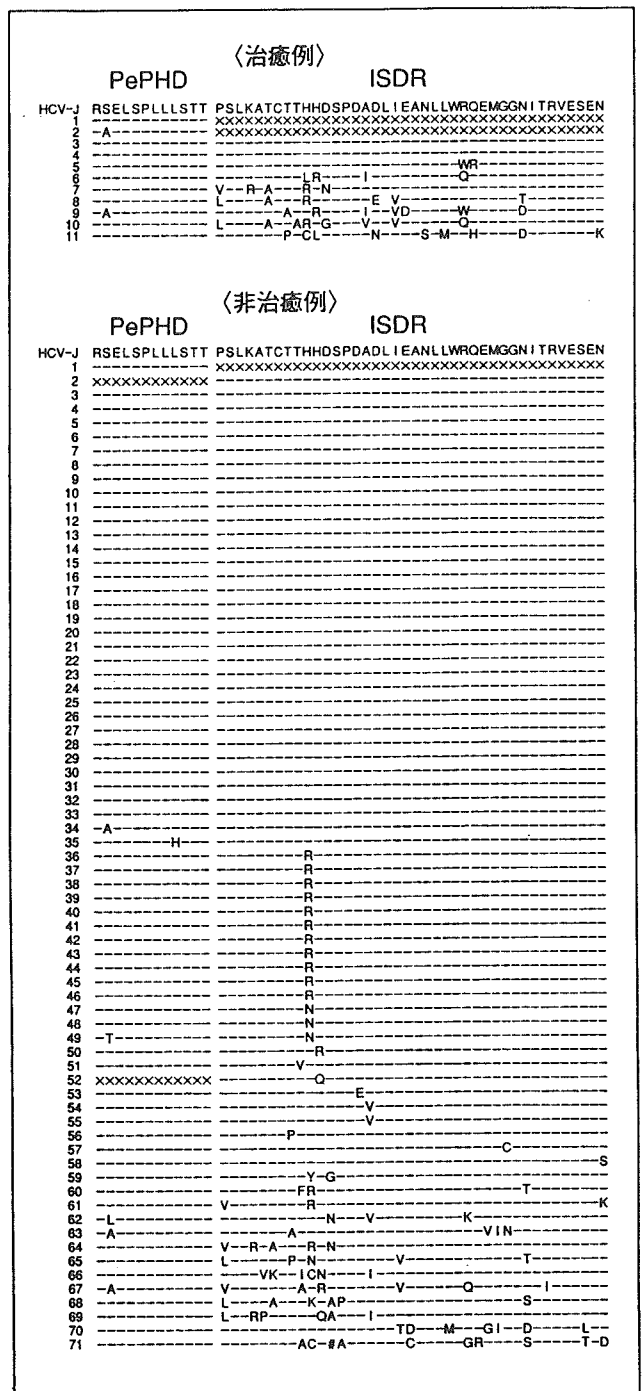


図 1 IFN による治癒例、非治癒例別にみた PePHD と ISDR のアミノ酸配列の変異 (文献 7 より引用) —は同一のアミノ酸, ×は決定不能であった配列。

合することにより PKR の抗ウイルス作用を阻害する可能性があることを報告した⁵⁾。それでは、実際の臨床例で、この PePHD 領域に変異が多いウイルスでは、果たして IFN に対する感受性が強いのであろうか。本稿では、IFN 治療を受けた症例について、ISDR と E2 領域のアミ

K K A V S P L L L T T T	PKR
. . . : : : : . . . : .	
R S E L S P L L L S T T	prototype 1b
-----	n=72
- A -----	n=5
- L -----	n=1
- T -----	n=1
----- H -----	n=1
-- Q ----- H -----	genotype 2a

図2 PePHD領域にみられたアミノ酸の変異の位置と頻度(文献7より引用)

今回調べた症例で、変異のあった症例のうち、8例中7例は2番目のアミノ酸の変異、残る1例は、genotype 2aと1bとが異なっている部位であった。

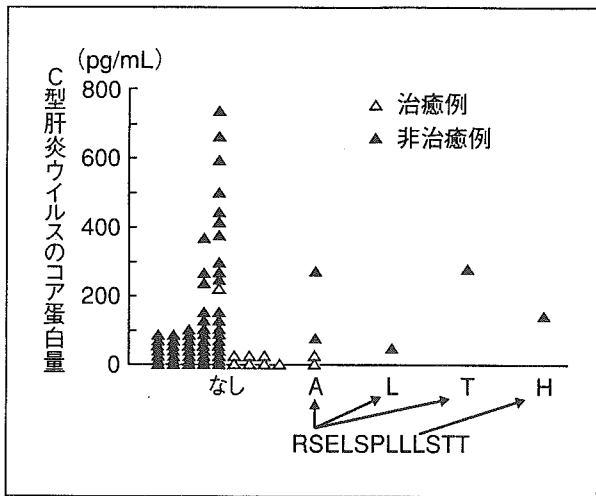


図4 PePHDのアミノ酸の変異とウイルス量(コア蛋白量)との関係(文献7より引用)

ノ酸配列を解析したわれわれの成績^{6,7)}をもとに、C型肝炎ウイルスの変異とIFN感受性に関して考察する。

IFN療法を受けた82例のgenotype 1bのC型慢性肝炎患者の保存血清を用いて、PePHD領域およびISDRのアミノ酸配列、ウイルス量(コア蛋白量)を解析した。図1にPePHD領域およびISDRのアミノ酸配列を治癒例、非治癒例別に示す。ISDRのアミノ酸変異は治癒例において明らかに多く、非治癒例では少ない。一方、PePHD領域のアミノ酸変異は、その頻度も少なく、治療効果との関連は認めなかったが、変異のみられた8例中7例でその変異は2番目のアミノ酸であり、残る1例の変異もgenotype 1bと2aで違いのあるアミノ酸であった(図2)。

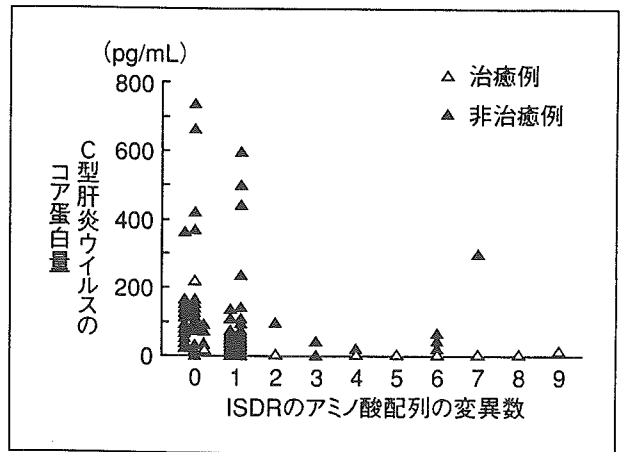


図3 ISDRのアミノ酸配列の変異数とウイルス量(コア蛋白量)との関係(文献7より引用)

表2 ISDRのアミノ酸の変異数とPePHD領域のアミノ酸配列との関連

ISDRの変異数	PePHD領域のアミノ酸配列の変異	
	なし	あり
0~2	56	3
>2	14	4

p=0.0479

このことから、この部位のアミノ酸は、ウイルスの増殖に何らかの重要な働きを有しており、限られた変異のウイルスしか存在し得ないようなものではないかと考えられた。さらに、ウイルス量とISDRおよびPePHD領域のアミノ酸配列の変異の関係をみてみると、ISDRのアミノ酸配列に変異が多い症例ほど、ウイルス量が少ない傾向にある(図3)。これとは対照的に、PePHD領域のアミノ酸配列の変異の有無と、ウイルス量の間には、明らかな関係は認められなかった(図4)。しかし、ISDRのアミノ酸配列の変異が多い症例ではPePHD領域のアミノ酸の変異も認められるといった傾向は認められた(表2)。

これらの結果から、IFNの治療効果に寄与する独立要因を多重ロジスティックモデルで多変量解析してみると、ウイルス量とISDRのアミノ酸配列の変異とは、IFNの治療効果を予測するうえで有用な予測因子であるが、PePHDのアミノ酸配列の変異はIFNの治療効果の予測に

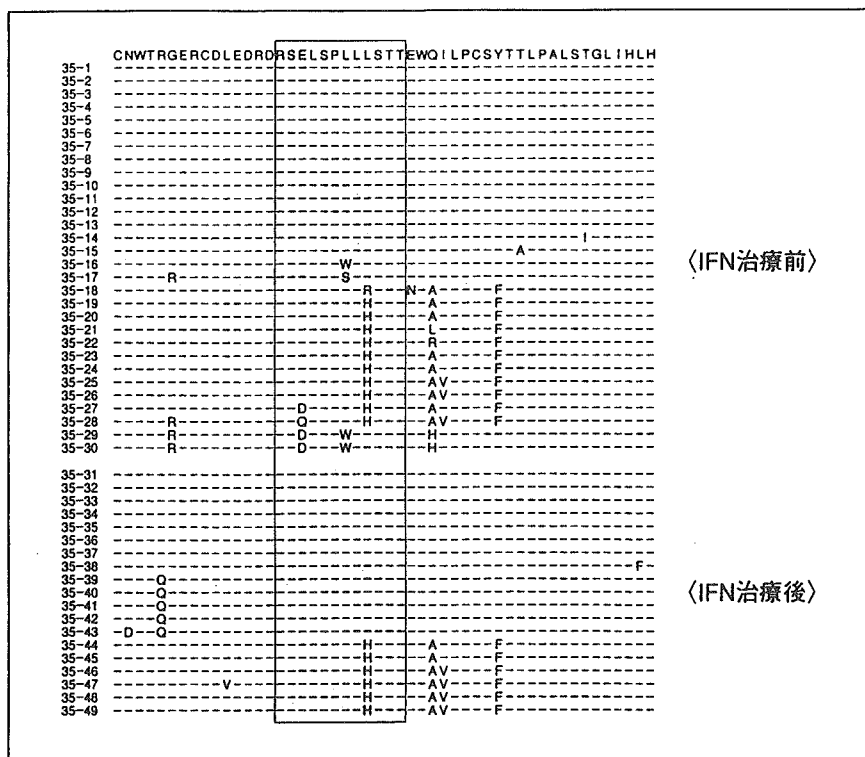


図5 IFN治療前後でPePHD領域を含む部位のアミノ酸配列を多数クローンで調べた症例(文献7より引用)
PePHD内に点在していたアミノ酸変異は治療後には消失して、かなり均一なものとなってきている。

は役立たないものと考えられた。しかし図5に示すように、PePHD領域のアミノ酸をクローニングして、多数のクローンでIFN治療前後を比較してみると、この領域のいろいろな部位にあった変異がIFN治療後には消失してきており、この領域のアミノ酸はやはりIFN抵抗性と関連があることが示唆された。

● おわりに

以上、HCV遺伝子からみたIFN療法の効果について述べた。近年、リバビリン併用⁸⁾やPEG-IFN⁹⁾など、C型慢性肝炎患者に対するIFN療法の選択肢が増え、良好な成績を示している。今後、ウイルス側の因子としてgenotypeやウイルス量のみならず、ISDRやPePHD領域の遺伝子変異を念頭におき、より有効なIFNを選択することにより、さらなる治療効果の向上が期待される。また、これらの領域のアミノ酸が生体内でどのような働きをしているのかが解

明されることが期待される。

文献

- 1) Takada N, Takase S, Takada A, Date T. J Hepatol 1993 ; 17 : 277-83.
- 2) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. J Clin Invest 1995 ; 96 : 224-30.
- 3) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. N Engl J Med 1996 ; 334 : 77-81.
- 4) Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, et al. Hepatology 1997 ; 25 : 745-9.
- 5) Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM, et al. Science 1999 ; 285 : 107-10.
- 6) Chayama K, Suzuki F, Tsubota A, Kobayashi M, Arase Y, Saitoh S, et al. Hepatology 2000 ; 32 : 1138-44.
- 7) 茶山一彰. 現代医療 2001 ; 33 : 2369-74.
- 8) McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. N Engl J Med 1998 ; 339 : 1485-92.
- 9) Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, et al. N Engl J Med 2000 ; 343 : 1666-72.

病診連携における最新ウイルス肝炎の診療

●治療法

B型慢性肝炎のインターフェロン療法

いまむらみちお*
今村道雄*ちやまかずあき*
茶山一彰*

Key Words

B型肝炎
インターフェロン
HBe抗原
セロコンバージョン
肝硬変* 広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学
専攻先進医療開発科学講座分子病態制御内科学

はじめに

1985年よりHBVワクチン、HBIG投与によって、母子感染の予防がなされるようになり、B型肝炎ウイルス(HBV)キャリアは減少してきているが、依然わが国には120～130万人のHBVキャリアが存在する。B型慢性肝炎は自然経過において年率11～12%にHBe抗原の陰性化、5～6%にHBe抗原からHBe抗体へのセロコンバージョン(SC)が生じ、大多数の症例では肝炎は終息する。しかしその一方でSCの生じない症例やSC後もALT値の異常が持続する症例も多く存在する。現在、B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法としてインターフェロン(IFN)療法と抗ウイルス剤であるラミブジンの投与が施行されている。B型慢性肝炎に対するIFN療法は、2000年以前は4週間までしか投与が認められていなかったため、自ずと治療効果に限界があったが、現在は24週投与が可能となり、その有用性が期待されている。本稿では国内外におけるIFNの成績を評価し、その適応と有効性について述べる。

HBV キャリアの自然経過

Genotype AのHBV感染ではキャリア化する頻度が高いことが報告されているが、わが国におけるHBVはそのほとんどがGenotype BまたはCで占められている。よって成人のHBV感染がキャリア化することは稀であり、HBVキャリアの感染経路のほとんどが母児感染である。幼少期はウイルス抗原に対する宿主側の認識が成立していない一種の免疫寛容状態にあるため、肝臓に炎症のない、いわゆる無症候性キャリアであるが、思春期に免疫系が完成してくると、HBVに対する免疫応答が始まり、慢性肝炎が発症する。そのうち多くの例では、HBe抗原からHBe抗体へのSCが生じ、肝炎は終息に向かうが、一部のSCの生じない例では、肝硬変、肝癌へと進行することがある。このため、従来、HBVに対する抗ウイルス療法の目標はSCであったが、SC後もpre-core変異株により、ALT値の異常が持続したり、HBe抗原が再陽性化する例があることから、現在ではALTの持続正常化が改めて重要視されている。B型慢性肝炎に対するIFN療法の保険適応はHBV-DNA陽

性かつ HBe 抗原陽性の活動性肝炎である。治療効果の面からは HBV-DNA 低値で ALT 高値（正常上限の 2～5 倍）を示す症例が最もよい適応である。また ALT のピーク直後の下降時期に投与を開始すると有効率が高い。HBe 抗原陰性の症例は IFN 療法の保険適応外であるが、その 15～20%に ALT 高値が持続する症例も存在し、これらの症例では IFN 治療が必要であると考えられている。加藤らは治療開始時の年齢が 30 歳未満の場合、IFN の治療効果が良好で、年齢が高くなるに従いその効果が低下することを報告している¹⁾。ラミブジンは長期投与が必要で中止時期が難しく YMDD 変異株の出現の問題や受精や妊娠・出産時の安全性が確認されておらず、若年層に対する初回治療としては IFN 投与が推奨されている。

HBe 抗原陽性例に対する IFN 療法

わが国では 2000 年以前は B 型慢性肝炎に対する IFN 療法の保険適応は 4 週間であり、その有効率は 10%と満足のいくものではなかった。近年、HBe 抗原陽性の B 型慢性肝炎に対し、24 週の IFN 投与が可能となり、その有用性は多く報告されている。Niederau らは HBe 抗原陽性例 103 例に IFN を投与し、HBe 抗原、HBs 抗原の消失を 53 例 (51%)、10 例 (10%) に認め、非投与群の 28.1%、0%に比べ有意に高率であり、さらに HBe 抗原の消失により生存率も改善したことを報告した²⁾。Wong らは HBe 抗原陽性例に対し、15 論文、総対象患者数 837 人を集計した結果、IFN 治療群では HBe 抗原、HBV-DNA、HBs 抗原の陰性化を 33%、37%、17%に認め、非治療群の 12%、17%、2%に比べ有意に高値であり、12 週以上の投与の有効性を報告している³⁾。国内における IFN 長期投与の報告として、林らは IFN 4 週投与群と 24 週投与群

の成績を比較し、HBe 抗原消失率は 4 週投与群での 8%に対し、24 週投与群では 22%と有意に高率であり、さらに ALT の改善も 24 週投与群において有意に高率であったことより、IFN の長期投与の有用性を報告している⁴⁾。さらなる長期投与として、Janssen らは 32 週間の IFN 投与により HBe 抗原の消失を 28%に認め、16 週間の投与による 12%に比べ有意に高率であったことを報告している⁵⁾。また金井らは IFN 24 週投与により HBe 抗原の消失を 24.7%に認めたが、50 週の投与により 35.1%に増加したことより、IFN のさらなる長期投与の有用性を報告している⁶⁾。しかしながら 24 週間の投与にも拘わらず、HBe 抗原の消失や ALT の正常化が得られない症例も多く存在し、HBe 抗原陽性例に対する IFN 療法はその投与量、投与期間について今後のさらなる検討が必要である。また近年、C 型慢性肝炎に対し、PEG-IFN 療法が広く施行されているが、B 型慢性肝炎に対する PEG-IFN の有用性も報告されており、今後の検討が期待される。

当施設にて IFN 療法を施行した HBe 抗原陽性の HBV キャリアの経過を示す (図 1)。症例は 32 歳女性、HBV キャリア。2001 年 5 月、ALT 300 IU/ml と上昇し、当科紹介受診した。HBe 抗原 240 COI、HBs 抗体 0%、HBV-DNA 量は TMA 法にて 5.6 LGE/ml であった。自然経過による SC を期待し、経過観察したが、3 カ月後も HBeAg 陽性、ALT 高値が持続したため IFN 療法を開始した。肝生検では A1F1 であった。IFN- β 6 MU を 2 週連日投与後、週 2 回、計 24 週投与した。IFN 投与開始後、一過性に ALT の上昇を認めたが次第に低下した。HBe 抗原も次第に低下し、投与終了 3 カ月後には HBe 抗体が陽性化、投与終了 1 年後には HBe 抗原は消失し SC が確認され、ALT も正常化した。現在も ALT は正常値であり、外来経過観察中であ

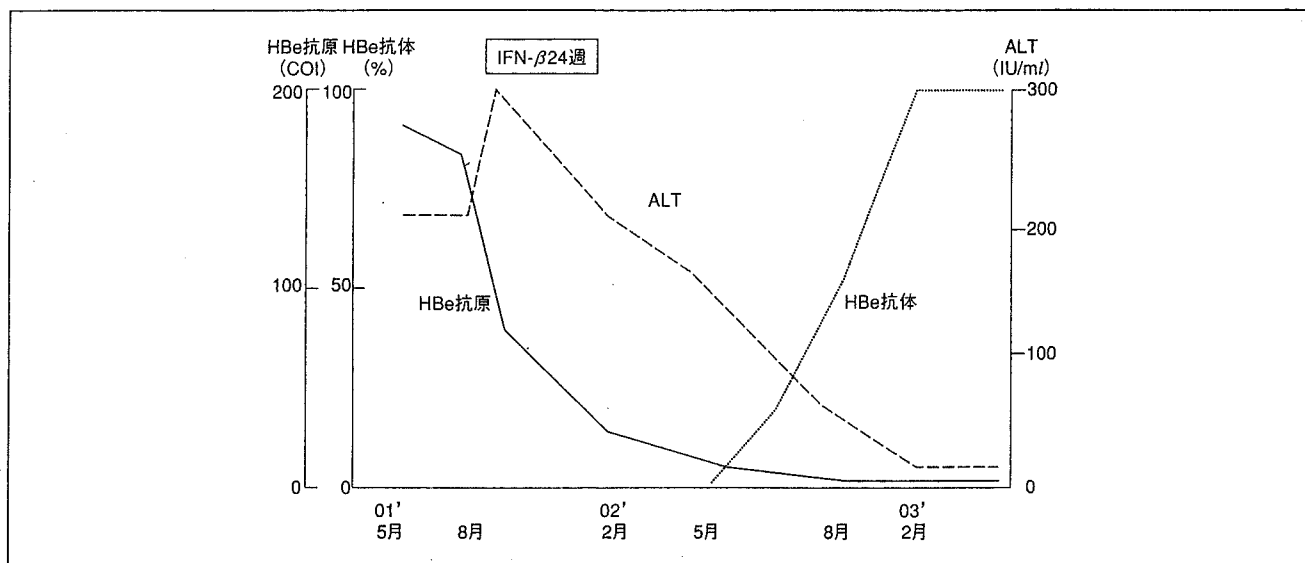


図1 IFN療法により、セロコンバージョンおよびALTの持続正常化が得られたHBe抗原陽性慢性B型肝炎症例

る。

HBe抗原陰性例に対する IFN療法

HBe抗原陰性の症例はIFN療法の保険適応外であるが、その15～20%にALT高値が持続する症例も存在し、これらの症例ではIFN治療が必要であると考えられている。LamperticoらはHBe抗原陰性、HBV-DNA陽性のB型慢性肝炎に対し、24カ月間、IFNを投与した結果、IFN投与群では非投与群に比べ、HBV-DNAの消失率およびALTの正常化率が有意に高値であり、さらにIFN投与群では肝生検の結果、線維化や炎症の改善が認められたことを報告している⁷⁾。荒瀬らはHBe抗体陽性でALT値が100 KU以上を繰り返すB型慢性肝炎患者24例にIFNを3カ月間投与し、14例(58%)でALT値の正常化を認めたことを報告している⁸⁾。HBe抗体陽性のB型慢性肝炎に対するIFN療法により、生存率が改善した報告もあり、ALT高値が持続する症例には積極的にIFN療法を施行すべきと思われる。しかしIFN終了後、ALTの再上昇を高率に認めることより、このような症例に対して、当科ではIFNの反復投与によ

り、ALTを低値に保っている。

IFN・ラミブジン併用療法

ラミブジンは逆転写酵素を阻害することにより、HBVのDNA鎖の伸長を停止させ、HBVの複製を阻害する。免疫賦活作用を持つIFNとは作用機序の異なるラミブジンを併用することにより、より強い抗ウイルス効果が期待される。Schalmらはラミブジン単独投与群、IFN単独群、IFN・ラミブジン併用群の3群を比較し、SC率がそれぞれ18%、19%、29%であり、IFN・ラミブジンの併用療法によりSC率が高率となることを報告している⁹⁾。また最近ではラミブジン投与中のYMDD変異株に対してのIFN療法の有用性も多く報告され、adefovirとともに治療法の実用性の1つとして重要である。

肝硬変に対するIFN療法

肝硬変に対するIFN療法は副作用の面より十分な検討がされておらず、一定の見解は得られていない。非代償性肝硬変に対するIFN投与は静脈瘤出血、腹水、脳症の出現や細菌感染や肝機能の急性増悪などが生じる可能性があり、Child B、Cの肝硬変に対してはIFN

療法は施行すべきではないと考えられている¹⁰⁾。代償性肝硬変に対する IFN 療法は非代償性に比べると安全性、有効性は高い。Perillo らは B 型肝硬変に対して、Child A では 5 例中 5 例 (100%)、Child B では 15 例中 5 例 (33%)、Child C では 6 例中 0 例 (0%) に IFN 療法が有効であったと報告している¹¹⁾。また IFN 療法により HBe 抗原の消失、ALT の正常化が得られれば、例え肝硬変であっても、生存率は増加することが報告されている¹⁰⁾。しかし例え代償性であっても、肝硬変症例では IFN 終了後、急激な肝機能の増悪をきたすことがあり、また現況では肝硬変に対する IFN は保険診療適応外であり、その投与は慎重に行うべきである。

予後および発癌に対する影響

B 型慢性肝炎に対し、IFN 投与による長期予後の改善が得られることが期待される。実際に IFN 療法によって HBe 抗原の陰性化や ALT の正常化、HBV-DNA の消失が認められた症例では生存率が有意に改善された報告は多くある。Marco らは HBe 抗原陽性の B 型慢性肝炎 109 例に対し IFN を投与した結果、統計学的解析により、肝硬変の非代償化のリスクが IFN 治療群で 0.311 倍に低下したと報告している¹²⁾。

B 型肝硬変では肝不全のみならず、肝癌の発癌率およびその進行の速さが大きな問題であり、日常診療においても初診時すでに治療困難な症例にもしばしば遭遇する。Ikeda らは B 型肝硬変 94 例に対し IFN を長期間歇投与し、投与終了 5 年後および 10 年後の肝癌発癌率は 7% および 17% で、非治療群の 19.6% および 38% に比べて有意に低率であったことを報告している¹³⁾。また Lin らは B 型慢性肝疾患患者に対する IFN 療法により、HBV-DNA の有意な低下のみならず、肝癌発癌率が 1.5% と非治療群の 12% に比べ有意に

低値であり、IFN 治療は累積肝癌発癌率および累積死亡率を有意に低下させたことを報告している¹⁴⁾。B 型肝硬変の肝癌発癌予防は非常に重要な課題であり、IFN 療法による発癌抑制は今後のさらなる検討を要すると思われる。

おわりに

現在、B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法としてラミブジンと IFN が使用されている。ラミブジンは強力な抗ウイルス効果を持つため、B 型慢性肝炎に対して使用頻度は増加しており、IFN の使用頻度は以前に比べ減少している。しかし、ラミブジンは耐性株出現が問題となること、若年者への第一選択としては IFN が望ましいこと、IFN の肝癌抑制効果など B 型慢性肝炎に対する IFN 療法は依然、重要なものである。今後は作用機序の異なる両者の併用療法、ラミブジン耐性株に対する IFN 療法、あるいは Peg-IFN など、B 型慢性肝疾患患者に対し、より有用な IFN の使用法の検討が必要である。

文 献

- 1) 加藤道夫・他：インターフェロン治療を行った B 型慢性肝炎例の長期予後について。肝臓 39:679-681, 1998
- 2) Niederau C et al.: Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. N Engl J Med 334:1422-1427, 1996
- 3) Wong DK et al.: Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. Ann Intern Med 119:312-323, 1993
- 4) 林 紀夫：B 型慢性肝炎に対する IFN 療法の長期予後と IFN の長期投与。犬山シンポジウム記録刊行会（編）：第 22 回犬山シンポジウム B 型慢性肝炎の新しい展開，p.68-69，アークメディア，2001
- 5) Janssen HLA et al.: Interferon alfa for chronic hepatitis B infection; Increased efficacy of prolonged treatment. Hepatology 30:238-243, 1999

- 6) 金井弘一・他：B型慢性肝炎に対するインターフェロン50週投与。肝臓41:254-261, 2000
- 7) Lampertico P et al.: A randomized, controlled trial of a 24-month course of interferon alfa 2b in patients with chronic hepatitis B who had hepatitis B virus DNA without hepatitis B e antigen in serum. *Hepatology* 26:1621-1625, 1997
- 8) 荒瀬康司・他：Transaminase値以上を示すe抗体陽性B型慢性肝炎に対するインターフェロン投与の有効性に関する検討。肝臓31:504-509, 1999
- 9) Schalm SW et al.: Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut* 46:562-568, 2000
- 10) Merle P et al.: Therapeutic management of hepatitis B-related cirrhosis. *J Viral Hepat* 8:391-399, 2001
- 11) Perrillo RP et al.: Low-dose, titratable interferon alfa in decompensated liver disease caused by chronic infection with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 109:908-916, 1995
- 12) Di Marco V et al.: The long-term course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 30:257-264, 1999
- 13) Ikeda K et al.: Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by the hepatitis B virus. *Cancer* 82:827-835, 1998
- 14) Lin SM et al.: Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 29:971-975, 1999

著者連絡先

(〒734-8551)

広島市南区霞 1-2-3

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻

先進医療開発科学講座分子病態制御内科学

茶山一彰

[E-mail: chayama@mba.ocn.ne.jp]



慢性肝炎

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻 先進医療開発科学講座
分子病態制御内科学 今村道雄・茶山一彰

はじめに

慢性肝炎は、6か月以上持続する慢性の肝機能異常を認める病態である。本邦における慢性肝炎患者の90%以上がB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) およびC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) によるウイルス性肝炎であり、このうちHBVが約30%、HCVが約70%である。HBVおよびHCV以外に非B非C型肝炎ウイルス、アルコール、自己免疫、薬剤アレルギーによるものなどがある。本項ではB型慢性肝炎とC型慢性肝炎の病態および治療について述べる。

B型慢性肝炎

Genotype AのHBV感染ではキャリア化する頻度が高いことが報告されているが、わが国におけるHBVはそのほとんどがGenotype BまたはCで占められており、成人のHBV感染は急性肝炎として発症するものの、一過性感染として治癒し、その後、終生免疫を獲得する。よってわが国でのHBVキャリアのほとんどはHBVキャリアの母親からの母子感染である。1985年よりHBVワクチン、高力価HBsヒト免疫グロブリン (HBIG) 投与による母子感染の予防がなされるようになり、HBVキャリアは減少してきているが、依然わが国には120~130万人のHBVキャリアが存在する。

幼少期はウイルス抗原に対する宿主側の認識が成立していない一種の免疫寛容状態にあるため、肝臓に炎症のない、いわゆる無症候性キャリアであるが、思春期に免疫系が完成してくると、HBVに対する免疫応答が始まり、肝炎が発症する。そのうち、年率11~12%にHBe抗原の陰性化、5~6%にHBe抗原陽性からHBe抗体陽性へのセロコンバージョンが生じ、大多数の症例では肝炎は終息する。B型慢性肝炎では自然経過によりHBVが排除されることは稀であるため、HBe抗原陽性からHBe抗体陽性へのセロコンバージョンが治療の目標となる。しかしその一方でセロコンバージョンの生じない症例やセロコンバージョン後もHBe抗原を産生しないpre-core mutantによりALT値の異常が持続する症例も多く存在する。これらの症例では抗ウイルス剤によりHBVの増殖を抑制し、ALT値を低値に保つこ

とが目標となる。現在、B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法としてインターフェロン (IFN) 療法と抗ウイルス剤であるラミブジンの投与が施行されている。

C型慢性肝炎

我が国のHCV感染者数は100~200万人といわれている。HCVは主に血液を介して感染し、感染経路としては、輸血、血液製剤、薬物常用者の注射器のまわしうち、刺青などがあげられ、稀ではあるが、母子感染、性行為感染も存在する。HCVのクローニング後、HCV抗体検査が献血時のスクリーニング検査に導入され、以後、輸血に伴う感染はほとんど無い。

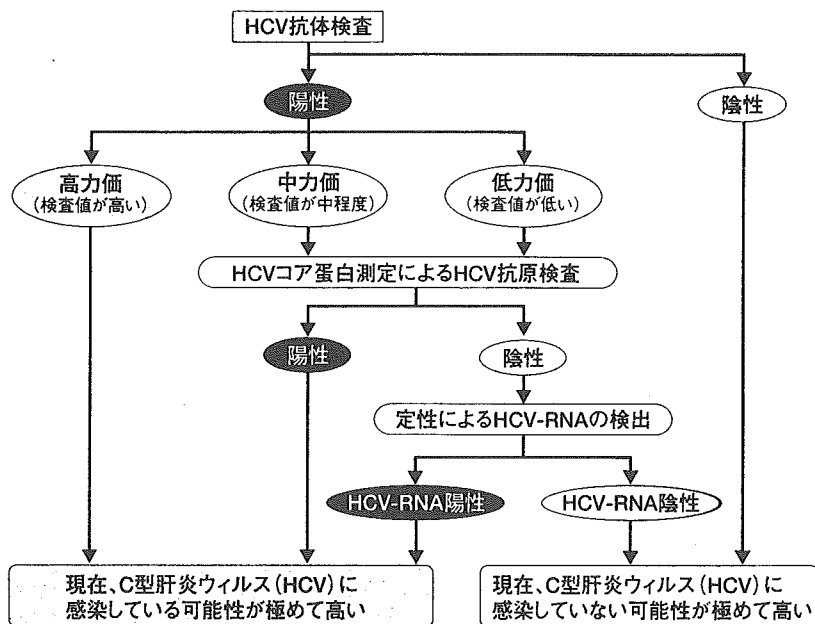
C型急性肝炎により多峰性に増減するトランスアミナーゼは次第に安定化、正常化する場合と、半年以上にわたり増減を繰り返す場合がある。前者では、ごく一部にHCVが自然排除される症例もあるが、ほとんどの場合は血中のHCV-RNAは持続的に陽性となり、いわゆる無症候性キャリアとなる。一方、半年以上にわたりトランスアミナーゼが増減を繰り返す場合は慢性肝炎へと移行する。いったん慢性化するとC型肝炎は自然治癒することは極めて稀である。C型慢性肝炎は、持続する肝細胞の破壊と再生のため、約15~20年の経過で増悪、寛解を繰り返しながら肝硬変に進展し、最終的には約20~30年で肝細胞癌へと病態が進行する。

C型慢性肝炎の診断方法として、血清中のHCV抗体の検出、HCV蛋白の検出およびHCV核酸の検出の方法がある (p.10、図1)。HCV抗体が高力価であれば、ほぼHCVの感染があるが、中力価、低力価の場合、過去のHCV感染の可能性もあり、HCVコア蛋白および核酸診断が必要となる¹⁾。コア蛋白質を測定することにより、短時間で血液中のHCVを直接検出および定量化することが可能である。しかし陰性であってもHCVの存在を完全には否定できず、この場合、HCV核酸診断が必要となる。HCV核酸診断にはReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を利用したアンプリコアHCV-RNA定性法による測定を行う。HCV抗体が低力価でアンプリコアHCV-RNA定性が陰性の場

合、過去のHCV感染と考えられる。

C型慢性肝炎の治療目的は、肝硬変、肝細胞癌への進展を阻止することであり、HCVの排除を第一目的とし、IFN療法やプリンスクレオシドアナログであるリバビリンの併用療法が広く施行されている。HCVの排除が困難な場合は、ウルソデオキシコール酸（UDCA：ウルソ®）やグリチルリチン製剤（SNMC：強力ネオミノファーゲンシー®）により炎症の軽減を目的とした治療を施行する。

図1 HCV検査の指針 文献1より改変



処方・症例提示

症例1 HBe抗原陽性B型慢性肝炎 (IFN療法)

〈処方例〉

IFN-β

600万単位2週連日投与後、週2回、計24週

(1日1回、静脈注射)

患者プロフィール：32歳女性。HBVキャリアの増悪。

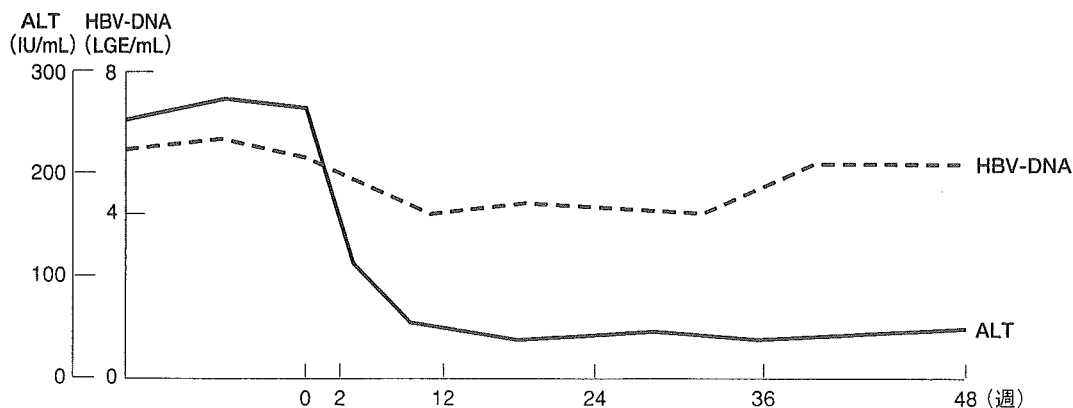
家族歴・既往歴：母親がHBVキャリア。

検査所見：T-bil 3.5 mg/dL、AST 193 IU/L、ALT 233 IU/mL、HBe抗原 240 COI、HBe抗体 0%、

HBV-DNA量5.6 LGE/mL (TMA法)であった。

治療経過〈図2〉：自然経過によるセロコンバージョンを期待し、経過観察したが、3か月後もHBeAg陽性、ALT高値が持続したためIFN療法を開始した。開始後ALTは低下、HBe抗原も次第に低下し、投与終了3か月後にはHBe抗体が陽性化、投与終了6か月後にはHBe抗原は消失しセロコンバージョンが確認され、ALTも正常化した。

図2 症例1の経過



	IFN-β 6MU/日	連日	2回/週		
HBe抗原 (COI)	240	230	50	30	0.7
HBe抗体 (%)	0	0	7	40	100

症例2 HBe抗原陰性B型慢性肝炎（抗ウイルス剤の経口投与）

〈処方例〉

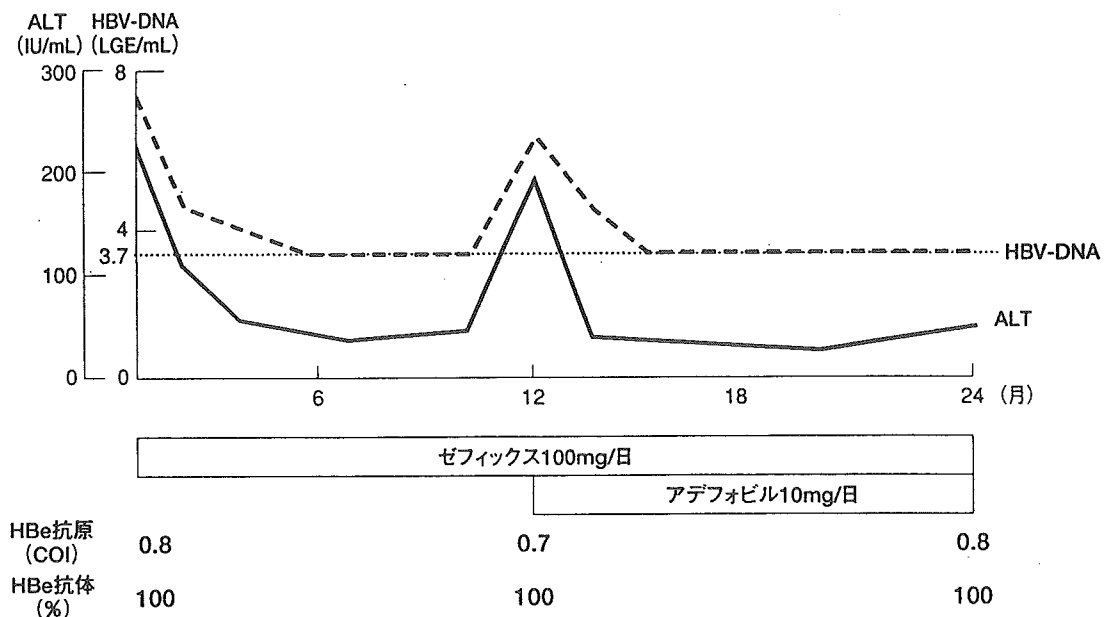
ゼフィックス錠100（100mg）
 1日100mg（1日1回、朝食後経口投与）
 アデフォビル
 1日10mg（1日1回、朝食後経口投与）

患者プロフィール：58歳男性。HBVキャリアの増悪。
 家族歴・既往歴：母親がHBVキャリア。
 検査所見：T-bil 5.2 mg/dL、AST 167 IU/L、ALT 219 IU/ml、HBe抗原陰性。HBe抗体100%。HBV-DNA量7.8 LGE/mL（TMA法）であった。

治療経過（図3）：ゼフィックス®（ラミブシン）の経口投与にてHBV-DNAは感度（3.7 LGE/mL）以下に低下、ALTも正常化した。以後、ゼフィックス®の内服を継続していたが、内服開始より1年後、突然HBV-DNAは5.9 LGE/mLと増加し、ALTも上昇した。耐性株の出現による肝炎の再燃と考え、アデフォビル®（adefovir dipivoxil、国内未発売）の内服を併用したところ、再びHBV-DNAは感度以下に低下し、ALTも正常化した。以後、経過良好である。

*アデフォビルは、我が国でも2004年10月に承認され、2004年12月薬価収載予定。
 商品名はヘプセラ錠®10（一般名 アデホビルピボキシル）。

図3 症例2の経過



症例3 1b、高ウイルス量のC型慢性肝炎（IFN+リバビリン併用療法）

〈処方例〉

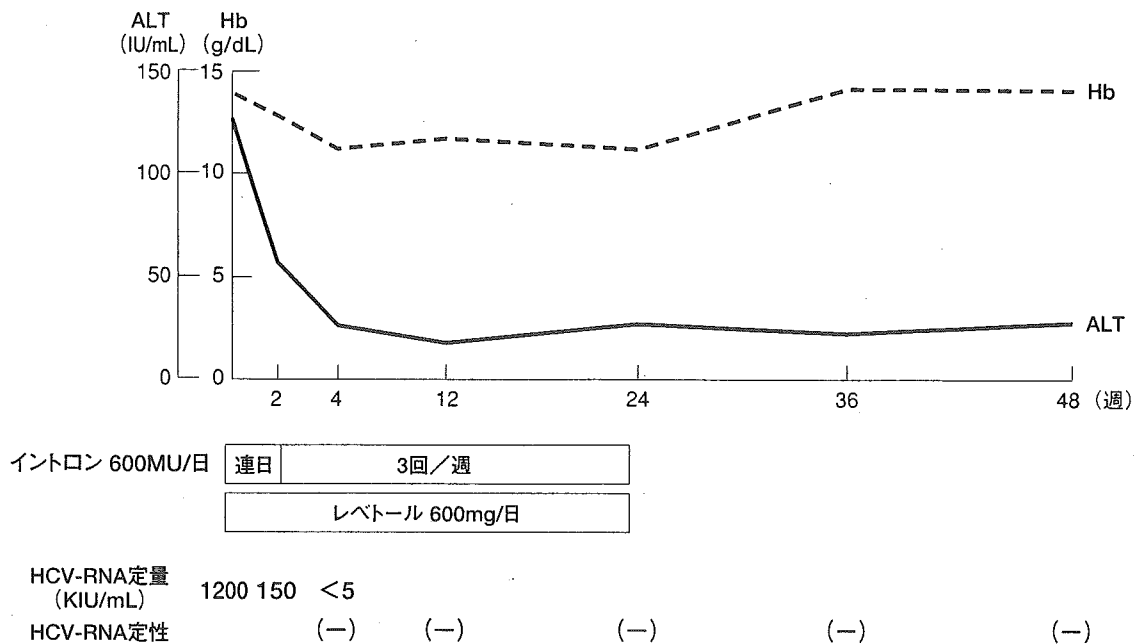
イントロンA注射用600
 1日600万単位2週間連日投与後、週3回、計24週（1日1回筋注）
 レベトールカプセル200mg
 1日600mg、6か月（1日2回、朝食後400mg、夕食後200mg経口投与）

患者プロフィール：56歳女性。C型慢性肝炎。
 家族歴・既往歴：37歳時、子宮筋腫にて手術、この際、輸血を受けた。
 検査所見：ALT 130 IU/mL、Hb 13.5 g/dL、HCV-RNA定量1,200 KIU/mL、genotype 1b。肝生検は

F1A2であった。

治療経過（p.12、図4）：イントロン®〈インターフェロンアルファ-2b（遺伝子組み換え）〉、レベトール®（リバビリン）開始2週後、ALTは78 IU/mL、HCV-RNA定量は150 KIU/mLに低下した。4週後、HCV-RNA定性は陰性化、ALTも正常化した。投与6か月後もHCV-RNAは陰性、ALTも正常値が維持され、投与を終了した。なお、レベトール®投与4週後、Hbは11.2 g/dLまで低下したが、症状なく、600 mg/日を継続した。終了6か月後、HCV-RNAは陰性であり、著効と判断した。以後、定期通院中であり、現在（治療終了3年後）もHCV-RNA定性は陰性、ALTは正常である。

図4 症例3の経過



解 説

B型慢性肝炎に対する治療方針

HBVキャリアの大多数は思春期にHBe抗原陽性からHBe抗体陽性へのセロコンバージョンが生じ、ウイルスの増殖は鎮静化し、肝炎は終息する。しかしその一方でセロコンバージョンの生じない症例やセロコンバージョン後もHBe抗原を産生しないpre-core mutantによりALT値の異常が持続する症例も多く存在し、これらの症例では抗ウイルス剤によりHBVの増殖を抑制し、ALT値を低値に保つことが目標となる。現在B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法としてIFN療法と抗ウイルス剤であるラミブジンの投与が施行されている。

● IFN療法

B型慢性肝炎に対するIFN療法の保険適応はHBV-DNA陽性かつHBe抗原陽性の活動性肝炎である。治療効果の面からはHBV-DNA低値でALT高値（正常上限の2～5倍）を示す症例が最もよい適応である。またALTのピーク直後の下降時期に投与を開始すると有効率が高い。HBe抗原陰性の症例はIFN療法の保険適応外であるが、その15～20%にALT高値が持続する症例も存在し、これらの症例ではIFN治療が必要であると考えられている。治療開始時の年齢が30歳未満の場合、IFNの治療効果が良好で、年齢が高くなるに従いその効果が低下することが報告されている。ラ

ミブジンは長期投与が必要で中止時期が難しく、変異株の出現の問題や受精や妊娠・出産時の安全性が確認されておらず、若年層に対する初回治療としてはIFN投与が推奨されている。症例1はこのような理由によりIFN療法を施行し、HBe抗原陽性からHBe抗体陽性へセロコンバージョンが得られた症例である。

わが国では2000年以前はB型慢性肝炎に対するIFN療法の保険適応は4週間であり、その有効率は10%と満足のものではなかった。近年、HBe抗原陽性のB型慢性肝炎に対し、24週のIFN投与が可能となり、その有用性は多く報告されている。HBe抗原陽性例に対するIFN療法により、HBe抗原、HBs抗原の消失を非投与群に比べ有意に高率に認め、さらにHBe抗原の消失により生存率も改善することが報告されている。WongらはHBe抗原陽性例に対し、15論文、総対象患者数837人を集計した結果、IFN治療群ではHBe抗原、HBV-DNA、HBs抗原の陰性化を33%、37%、17%に認め、非治療群の12%、17%、2%に比べ有意に高値であり、12週以上の投与の有効性を報告している²⁾。しかしながら24週間の投与にも拘わらず、HBe抗原の消失やALTの正常化が得られない症例も多く存在し、HBe抗原陽性例に対するIFN療法はその投与量、投与期間について今後のさらなる検討

が必要である。

HBe抗原陰性の症例はIFN療法の保険適応外であるが、その15～20%にALT高値が持続する症例も存在し、これらの症例ではIFN治療が必要であると考えられている。HBe抗原陰性のB型慢性肝炎にするIFN療法にて、IFN投与群では非投与群に比べ、HBV-DNAの消失率およびALTの正常化率が有意に高値であり、さらにIFN投与群では肝生検の結果、線維化や炎症の改善が認められたことも報告されている。HBe抗体陽性のB型慢性肝炎に対するIFN療法により、生存率が改善した報告もあり、ALT高値が持続する症例には積極的にIFN療法を施行するべきと思われる。しかしIFN終了後、ALTの再上昇を高率に認めることより、このような症例に対して、当科ではIFNの反復投与により、ALTを低値に保っている。

● ラミブジン

ラミブジンはもともと human immunodeficiency virus (HIV) の治療薬として開発されたヌクレオシド誘導体の抗ウイルス薬である。ラミブジンは逆転写酵素を阻害することにより、HBVのDNA鎖の伸長を停止させ、HBVの複製を阻害することにより、B型慢性肝炎の治療薬としても有用であることが判明し、2000年9月よりB型慢性肝炎に対する適応が認められている。ラミブジンは自然経過でHBe抗原のセロコンバージョンが得られにくく進行性の可能性の高い症例（35歳以上でHBV-DNA高値例）やHBe抗体陽性の活動性肝炎を対象として投与する。またB型慢性肝炎の急性増悪により肝不全に陥った症例や抗癌剤やステロイド療法を開始するHBVキャリアは絶対適応と考えられている。ラミブジンは強力にHBVの合成を抑制する。当科では半年間のラミブジン投与によりHBV-DNAの陰性化を79例中68例（77%）に認めた。またHBe抗原の陰性化率は投与1年後18%、2年後22%、3年後28%であった。わが国におけるラミブジンの成績は1年目では海外と同程度であるが、それ以後の投与では、HBV-DNA陰性化率やHBe抗原消失率は上昇せず、海外の成績より低い。これはわが国ではHBV genotype BおよびCが多いことからラミブジン投与による経過に違いが生じていると推察されている。

ラミブジンの問題点として、投与中止後のHBVの再増殖および投与中の耐性株の出現がある。ラミブジンは細胞質内で強力にHBVの合成を阻害するが、

核内に存在する covalently closed circular (ccc) DNAは排除されないため、投与中止によりHBVの増殖は再開する。ラミブジン中止によるHBV再増殖のため、重篤な肝炎の増悪を来すことがあり、ラミブジン投与開始前には、十分なインフォームドコンセントが必要である。また6か月以上の長期投与により耐性株（YMDD変異株）が出現し、肝炎の再燃がみられることがある。ラミブジン投与中、RNA依存性DNAポリメラーゼのC-ドメインに存在するYMDDモチーフのメチオニンがバリン（M204V；YVDD）あるいはイソロイシン（M204I；YIDD）に変異することによりラミブジンが取り込まれなくなり、これらの耐性株が増加（Breakthrough）し、その後、肝炎の増悪（Breakthrough hepatitis）が生じる。当科においてラミブジンを投与した症例における耐性株の出現率は投与1年後で19%、2年後で46%、3年後で53%であった。また耐性株出現率はHBe抗原陽性群と陰性群で有意差は認めなかった。耐性株はラミブジン投与前のHBV-DNAが多いほど出現しやすい。ラミブジン投与中はHBV-DNA量、トランスアミナーゼなどの変動に注意し、BreakthroughやBreakthrough hepatitisが生じた場合は、投与を中止するのではなく、ラミブジン耐性株に有効なヌクレオシド誘導体（アデフォビルなど）の併用やIFN、グリチルリチン製剤で対処する必要がある。症例2はHBe抗原陰性のpre-core mutantによる肝炎の増悪に対し、ゼフィックス®を投与し、一旦は肝炎は沈静化したものの、耐性株が出現し、Breakthrough hepatitisが生じたため、ゼフィックス®を継続したまま、アデフォビルを併用し、再びHBVの増殖抑制、肝炎の沈静化が得られた症例である。

C型慢性肝炎に対する治療方針

● IFN療法

C型慢性肝炎の治療目的は、肝硬変、肝細胞癌への進展を阻止することであり、HCVの排除を第一目的とし、HCVの排除が困難な場合は、炎症の軽減を目的とした治療を行う。HCV排除のためには、IFN療法が広く行われている。IFN療法により著効（治療終了後6か月以上の持続的な血清ALTの正常化およびHCV-RNAの陰性化）となるのは、日本においては約30～40%である。IFNの効果は遺伝子型により大きく影響する。HCV遺伝子はその塩基配列の相同性に

より、各genotypeに分類される。またNS3-4領域のアミノ酸に対する抗体の型により、genotype 1a, 1bを serological group 1に、genotype 2a, 2bを serological group 2に分類する方法が広く用いられている。日本では、1bが約70%、2aが約20%、2bが約10%認められ、それ以外の型は1%以下と稀である。日本に最も多く存在するgenotype 1bでは、ウイルス量が多い症例が多く、また同じウイルス量でもIFNが効きにくい症例が多い。よって1b、高ウイルス量の症例に対して、IFN単独療法では著効率は10%未満と低い。しかし近年、抗ウイルス活性を示すプリンヌクレオシドアナログであるリバビリンを用いたIFN+リバビリン併用療法が施行され、その著効率は約20%に増加している。表に自験例224例のgenotype別のIFN療法（リバビリン併用療法を含む）による著効率を示す。症例3は1b、高ウイルス量とIFN抵抗性であり、イントロン®+レベトール®併用療法を施行し、著効が得られた症例である。リバビリンがなぜIFNの効果を増強するのかについては、明確には解明されていないが、リバビリンの免疫賦活作用によりIFNの作用が増強されると考えられている。リバビリンの主な副作用として溶血性貧血がある。ヘモグロビンが10 g/dL未満になるとリバビリンの減量が必要であり、さらに8.5 g/dL未満になると投与を中止しなければならない。またリバビリンには催奇形性の問題もあり、妊娠の可能性のある女性には禁忌であり、パートナーが妊娠する可能性のある男性は避妊が必要である。

近年、新しいIFNとしてコンセンサスIFNやPEG-IFNが使用されている。コンセンサスIFNは、IFNの活性をより強力なものとするため、従来知られていた13種類のIFN- α のそれぞれのアミノ酸配列を検討し、各アミノ酸配列の位置で最も出現頻度の高いアミノ酸からなるIFNを遺伝子組み換え大腸菌で産出させたものであり、従来のIFNに比べ力価が高い特徴がある。PEG-IFNはIFN分子にポリエチレングリコール（PEG）を付加して精製したもので、従来のIFNよりも長期間にわたり血中濃度が維持されることにより、週1回の投与で治療効果が維持される。コンセンサスIFNおよびPEG-IFNとも従来のIFNに比べ、高いHCV排除率を認めており、今後、これらのIFNとリバビリンの併用療法により、さらなる治療効果が期待される。

表1 HCV genotype別によるインターフェロン（リバビリン併用療法を含む）の著効率

genotype	1b (n=157)	2a (n=33)	2b (n=34)
IFN著効率	25%	73%	71%

● 肝庇護療法

ウイルスの排除が困難な症例や副作用によりIFNが使用できない症例には肝硬変、肝癌への進展を抑制するため、ALT値を可能な限り低値に維持する。C型慢性肝炎のALTの目標値はC型慢性肝炎stage 1（F1）では、正常上限の1.5倍（60 IU/mL）以下、stage 2～3（F2～F3）では、極力正常値（40 IU/mL）以下にコントロールすることが望ましい。ALT値を低値に維持するため、主に使用されるのはUDCAおよびSNMCである。SNMCはグリチルリチン製剤で、抗炎症作用、免疫調節作用、肝細胞障害抑制作用、ウイルス増殖抑制作用を持つと考えられており、通常40～60 mLを週2～3回から連日、静脈内投与する。効果がみられない場合は100 mLまで増量する。UDCAは肝細胞保護作用、利胆作用、免疫調節作用などから、肝障害を改善すると考えられている。一般に600 mg/日を投与する。ALT値が100 IU/mL以下の症例ではUDCAの内服によりALT値の改善が期待されることより、ALT値が100 IU/mL以下の症例に対しての第一選択はUDCA 600 mg/日、ALT値が100 IU/mL以上の症例に対しての第一選択はSNMC（40～100 mL/日）+UDCA 600 mg/日を開始する。またSNMCおよびUDCA併用療法にてもALTが低値とならない症例では、IFN少量間歇療法（3 MU/日、週3回）や瀉血療法も有効である。IFNの投与や血清トランスアミナーゼを正常に保つことは肝細胞癌の合併を低下させることが報告されており、C型肝炎患者の診療において重要である。

参考文献

1. 吉澤浩司. 医療研究分野からの最新情報 C型慢性肝炎 検査と治療の現状. 新薬と治療 52: 14-18, 2002
2. Wong DK, et al. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 119:312-23, 1993.

Infection of Human Hepatocyte Chimeric Mouse With Genetically Engineered Hepatitis B Virus

Masataka Tsuge,^{1,2} Nobuhiko Hiraga,^{1,2} Hideki Takaishi,^{1,2} Chiemi Noguchi,^{1,2} Hiromi Oga,^{1,2} Michio Imamura,^{1,2} Shoichi Takahashi,^{1,2} Eiji Iwao,³ Yoshifumi Fujimoto,^{2,4} Hidenori Ochi,^{2,4} Kazuaki Chayama,^{1,2,4} Chise Tateno,^{2,5} and Katsutoshi Yoshizato^{2,5,6}

Studies of hepatitis B virus (HBV) mutants have been hampered by the lack of a small animal model with long-term infection of cloned HBV. Using a mouse model in which liver cells were highly replaced with human hepatocytes that survived over a long time with mature human hepatocyte function, we performed transmission experiments of HBV. Human serum containing HBV and the virus produced in HepG2 cell lines that transiently or stably transfected with 1.4 genome length HBV DNA were inoculated. Genetically modified e-antigen-negative mutant strain also was produced and inoculated into the mouse model. A high-level ($\approx 10^{10}$ copies/mL) viremia was observed in mice inoculated with HBV-positive human serum samples. The level of viremia tended to be high in mice with a continuously high human hepatocyte replacement index. High levels and long-lasting viremia also were observed in mice injected with the *in vitro* generated HBV. The viremia continued up to 22 weeks until death or killing. Passage experiments showed that the serum of these mice contained infectious HBV. Genetically engineered hepatitis B e antigen-negative mutant clone also was shown to be infectious. Lamivudine effectively reduced the level of viremia in these infected mice. **In conclusion**, this mouse model of HBV infection is a useful tool for the study of HBV virology and evaluation of anti-HBV drugs. Our results indicate that HBeAg is dispensable for active viral production and transmission. (HEPATOLOGY 2005;42:1046-1054.)

Hepatitis B virus (HBV) is a small enveloped DNA virus and causes chronic infection of the liver that often leads to chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma.¹⁻⁴ The lack of a

practical small animal model has impeded the study of the biology of this virus and the development of effective antiviral therapies. Chimpanzee is the only natural host that allows active replication of HBV.⁵⁻⁷ Although this animal is a valuable model for the study of hepatitis viruses,⁸ the practical use of chimpanzees is severely limited both ethically and economically.

Several small animal models of HBV infection have been reported. The HBV transgenic mouse is a very useful model for the study of virology and evaluation of antiviral drugs.⁹⁻¹² However, the liver cells of this model are not permissive for HBV infection; therefore, studying virus-cell interactions such as receptor binding and entry is not possible. The HBV-trimer mouse is another useful mouse model.¹³ In this model, *ex vivo* HBV-infected human liver fragments are implanted into lethally irradiated mice after SCID mouse bone marrow transplantation. Approximately 80% of the mice develop viremia 2 to 3 weeks after infection. However, the rate of positivity subsequently decreases to less than 20% 6 weeks after infection. The level viremia is approximately 10^5 copies/mL. More recently, HBV-containing human serum samples were used to infect human hepatocyte repopulated mice.¹⁴ A high-level viremia (4.5 and 10×10^8 copy/mL) and HBs antigenemia are observed 8 weeks after injection. This mouse model is promising because HBV replicates in natural host cells, human hepatocytes. However,

Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; WHV, woodchuck hepatitis virus; HSA, human serum albumin; PCR, polymerase chain reaction; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B surface antigen; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium.

From the ¹Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Minami-ku, Hiroshima-shi; the ²Liver Research Project Center, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; the ³Pharmaceuticals Research Unit, Mitsubishi Pharma Corporation, Yokohama; the ⁴Laboratory for Liver Diseases, SNP Research Center, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Yokohama; the ⁵Yoshizato Project, CLUSTER, Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science and Technology, Higashihiroshima; and the ⁶Developmental Biology Laboratory and Hiroshima University 21st Century COE Program for Advanced Radiation Casualty Medicine, Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan.

Received March 20, 2005; accepted August 14, 2005.

Supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare. A part of this work was carried out at the Research Center for Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Hiroshima University.

Address reprint requests to: Prof. Kazuaki Chayama, M.D., Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan. E-mail: chayama@hiroshima-u.ac.jp; fax: (81) 82-255-6220.

Copyright © 2005 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.20892

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Table 1. Table Inoculum Used for Infection Experiments

Inoculum	Source	Transfection	HBs Antigen	HBe Antigen	HBV DNA (LGE/mL)
Serum 1	HBV carrier 1	—	+	130	10.8
Serum 2	HBV carrier 2	—	+	150	8.7
CA59	pCAG-HB-wt	Stable	6.3 ± 2.8	15 ± 7	8.0 ± 0.2
CM3	pTRE-HB-wt	Transient	3.9 ± 1.5	105 ± 7	8.3 ± 0.4
Fresh CM3	pTRE-HB-wt	Transient	ND	ND	8.0
e-Negative	pTRE-HB (PC)	Transient	2.9 ± 0.2	0.5 ± 0.3	8.1 ± 0.3
Mouse CM3	CM3-infected mouse	—	ND	ND	ND

NOTE. Fifty microliters of each serum or cell culture supernatant was used for injection except for fresh CM3 (500–1,000 μ L) and mouse CM3 (5 μ L). Data are mean \pm SD.

Abbreviations: LGE, log genome equivalent; ND, not determined.

long-term high-level viremia has not been reported so far in this model, probably because of technical difficulties in maintaining large quantities of human hepatocytes in these mice.

Long-term HBV viremia was reported after subcutaneous transplantation of immortalized human hepatocytes in RAG-2–deficient mice after transfection of circularized full-length HBV genome.¹⁵ Viremia of up to 3×10^8 copy/mL was still observed in these mice at least 5 months after transplantation. This long-term viremia model should be useful for *in vivo* HBV studies. However, the production and selection of HBV-secreting immortalized human hepatocytes takes a long time, and the level of viremia in the transplanted animal depends on the volume of live immortalized cells in mice. The mode of viremia might be different from natural infection because the pregenome RNA is transcribed from integrated HBV. Whether the produced HBV re-infects implanted immortalized human hepatocytes has not been confirmed.

A useful woodchuck hepatitis virus (WHV) infection model was established by Petersen et al.¹⁶ They showed high-level replacement of uPA/Rag-2 knockout mice liver with woodchuck hepatocytes and development of high-level (1×10^{11} virion/mL) WHV viremia. Dandri et al.¹⁷ transplanted *Tupaia* hepatocyte into uPA/RAG-2 mice and showed up to 8.2×10^7 genome equivalent/mL viremia. This model is useful because viremia continued up to 29 weeks. However, probably because of different host cells, the replication levels of HBV are lower than those of woolly monkey HBV. Using SCID mouse homozygous for Alb-uPA transgene, the group of Mercer and colleagues¹⁸ were the first group to report high-level replacement of mouse liver with human hepatocytes and successful infection of these mice with hepatitis C virus. Recently, we also created a human hepatocyte chimeric mouse in which the hepatocytes were highly replaced by implanted human liver cells.¹⁹ The repopulation index calculated from serum human serum albumin (HSA) concentrations exceeded 70% in 32% of the transplanted mice, and these animals survived up to 80 days after transplanta-

tion with high replacement index. Using this chimeric mouse, we performed transmission experiments of HBV. Using serum samples obtained from patients with chronic HBV infection, high-level viremia (approximately 10^{10} copies/mL) was observed up to 22 weeks in mice inoculated with HBV-positive human serum samples. We also performed infection study using *in vitro*–generated HBV. Infectious HBV was produced in HepG2 cell lines by transfecting with 1.4 genome length HBV DNA. Because mice injected with this *in vitro*–produced virus developed viremia, we further performed passage study. In addition, we introduced point mutations in HBV genome to create an HBe antigen–negative variant. The mice inoculated with this HBe antigen–negative variant developed viremia. Lamivudine effectively suppressed replication of HBV in mice inoculated with human serum samples and wild-type *in vitro*–created HBV. This model is a useful tool for the study of the nature of HBV mutants and development of anti-viral drugs.

Materials and Methods

Human Serum Samples. Serum samples were obtained from four HBV carriers after obtaining written informed consent. Inocula for mice were obtained from two patients who tested positive for HBs and HBe antigens with slightly elevated levels of serum alanine aminotransferase and high-level viremia (Table 1). Serum samples for extraction and cloning of HBV were obtained from the remaining two patients who were positive for hepatitis B e antigen (HBeAg) and had high-level HBV DNA (6.9×10^9 and 9.8×10^{10} copies/mL by real-time polymerase chain reaction [PCR], respectively). All of these HBV belonged to genotype C.

Analysis of HBV Markers. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and HBeAg were measured by commercially available ELISA (Abbott Japan, Osaka, Japan). For quantitative analysis of HBV DNA, 100 μ L serum samples or culture supernatants were used. DNA was extracted from these samples by SMITEST (Genome

Science Laboratories, Tokyo, Japan) and was dissolved in 20 μ L H₂O. One microliter DNA solution was amplified by Light Cycler (Roche Diagnostics, Japan, Tokyo) for quantitation of HBV. The primers used for amplification were 5'-TTTGGGCATGGACATTGAC-3' and 5'-GGTGAACAATGTTCCGGAGAC-3'. The amplification condition included initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 58°C for 5 seconds, extension at 72°C for 6 seconds. The lower detection limit of this assay is 300 copies. Nested PCR was used to detect a small amount of HBV DNA with the outer primers X1F1 (5'-CGCGGGACGTCCTTTGTCTA-3') and X2R1 (5'-GTTACGGTGGTCTCCATGC-3') and inner primers X1F2 (5'-TACGTCCCCTCGGCGCTGAA-3') and X2R2 (5'-CAGAGGTGAAGCGAAGTGCA-3'). The amplification condition included 35 cycles of 94°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes after 2 minutes of initial denaturation at 94°C followed by 7 minutes of final extension using Gene Taq (Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan) with anti-Taq high (TOYOBO Co., Osaka, Japan) according to the instructions provided by TOYOBO.

Cloning of HBV DNA and Plasmid Construction.

Full-length HBV DNA was amplified using these HBV DNA samples by the method of Gunther et al.²⁰ and cloned into pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA). HBV DNA, 1.4 genome length, obtained from one of these two patients was cloned into pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) after replacement of CMV promoter with CAG to yield pCAG-HB-wt. Similarly, 1.4 genome length HBV DNA from the other patient was cloned into a plasmid vector pTRE2 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and designated pTRE-HB-wt. A modified plasmid pTRE-HB-PC was generated by introducing a G-to-A point mutation to nucleotide 1896 to create precore stop codon (TTG to TAG). The substitution was introduced by a commercially available site directed mutagenesis kit (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene). Nucleotide sequences of the HBV cloned into plasmids pCAG-HB-wt and pTRE-HB-wt were deposited into the GenBank database under accession numbers AB206817 and AB206816, respectively.

Transfection of HepG2 Cell Lines With 1.4 Genome Length HBV DNA and Endogenous Polymerase Reaction Analysis. HepG2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum at 37°C and under 5% CO₂. The cells were seeded to semi-confluence in 6-well tissue culture plates. For transient transfection experiments, two plasmids; pTRE-HB-wt and pTRE-HB-PC, were used. Two micrograms of each plasmid was transfected using Fu-

gene 6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) according to the instructions provided by the supplier. Three to five days after transfection, the culture supernatant was collected for infection of mice and quantitative analysis of HBV DNA by real-time PCR. Alternatively, calcium phosphate precipitation was performed to prepare fresh supernatant for large-dose administration experiments. Concentrated supernatants were prepared by using Microsep 10K spin filter, according to the instructions provided by the manufacturer (Pall Life Sciences., Ann Arbor, MI). The HBV particles produced in the supernatants were immunoprecipitated with protein A sepharose and mouse anti-HBs monoclonal antibody 2Z824Z (Institute of Immunology, Tokyo, Japan) and subjected to endogenous polymerase reaction²¹ and Southern blot analysis after sodium dodecyl sulfate/proteinase K digestion followed by phenol extraction and ethanol precipitation. The DNA was electrophoresed in a 1% agarose gel and transferred onto a nylon membrane. The transferred DNA was detected with full-length HBV DNA probe synthesized with the PCR DIG probe synthesis kit and the DIG Nucleic Acid Detection kit and CSPD, ready-to-use (Roche Diagnostics) in the Fluor-S Max MultiImager (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA).

For the production of stably transfected cell lines, HepG2 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C and 5% CO₂. Cells were seeded into 90-mm-diameter culture dishes. Twenty micrograms of the plasmid pCAG-HB-wt was transfected by calcium precipitation. Twenty-four hours after transfection, the cells were split and cultured in G418 selection DMEM (1 mg/mL). One hundred fifty colonies were isolated and amplified for identification of virus-producing cell lines. Clones positive for both HBs and HBe antigens were selected and further analyzed for production of HBV particles. Finally, one of five cell lines that produced more than 10⁵ copy/mL HBV DNA in supernatant were selected and used for further experiments. This cell line produced stable levels of HBV DNA for more than 12 months (data not shown).

Analysis of HBV Produced in the Supernatant of Transfected HepG2 Cell Lines by Sucrose Density Gradient. Five milliliters HBV-positive serum (10⁸ copy/mL) or 100 mL cell culture supernatant (10⁷ copy/mL) was layered on a 20% (wt/wt) sucrose gradient, and centrifuged at 24,000 rpm for 1 hour at 4°C with a Beckman SW28 rotor Beckman Coulter, Fullerton, CA). The precipitate was resuspended with 500 μ L phosphate-buffered saline. These HBV samples were layered on a linear 20% to 50% (wt/wt) sucrose gradient. Centrifugation was carried out at 24,000 rpm for 21 hours at 4°C with a Beckman SW40 rotor. The gradients were frac-