

2005 00713A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝硬変に対する治療に関する研究

平成17年度

総括研究報告書

分担研究報告書

(1/2)

主任研究者

八橋 弘

平成18(2006)年3月

目 次

I. 総括研究報告

1. 八橋 弘
肝硬変に対する治療に関する研究……………1

II. 分担研究報告

1. 石橋 大海
C型慢性肝炎肝硬変に対するpeg-IFN+リバビリン療法の現状に関する研究…17
2. 古賀 満明
B型慢性肝疾患に対するラミブジン治療の現状……………21
3. 袖山 健
当院でのB型慢性肝疾患ラミブジン治療例の予後：発癌・肝癌再発、(自然経過例・IFN治療例との比較も含めて)……………24
4. 林 茂樹
国立病院機構病院・ナショナルセンターにおける肝細胞癌の予後に関する研究
(第二次)……………29
5. 酒井 浩徳
国立病院機構九州医療センターにおけるC型慢性肝炎に対するインターフェロン
治療成績 F1、2症例とF3、4症例における比較検討……………32
6. 加藤 道夫
0・2 ratio、0・4 ratio を用いた Peg-IFN α 2b/Ribavirin 併用治療効果予測と背景
肝予備能……………37
7. 原田 英治
C型肝硬変に対するIFN治療効果の検討……………40
8. 竹崎 英一
慢性C型肝炎に対するペグイントロン/リバビリン併用療法の成績……………44
9. 肱岡 泰三
C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果が肝細胞癌初発時の肝機能及び
発癌後予後に対して与える影響……………48
10. 肱岡 泰三
C型慢性肝炎に対するIFN治療効果を予測することが可能か
—難治群に対して減量・中止することなくイントロンA・リバビリン併用療法を
完遂できた症例での検討—……………51

1 1.	脇岡 泰三	肝細胞癌根治術後に対する再発予防の必要性—高再発群の選出—	54
1 2.	室 豊吉	C型慢性肝炎進行例に対する部分的脾動脈塞栓術後のインターフェロン治療についての検討	60
1 3.	小松 達司	当院におけるペグインターフェロン+リバビリン併用療法の現状	65
1 4.	正木 尚彦	C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン治療の早期ウイルス学的効果規定因子に関する研究	69
1 5.	足立 浩司	B型慢性肝炎進行例におけるラミブジン治療の問題点の検討	72
1 6.	増本 陽秀	B型慢性肝炎および肝硬変のラミブジン治療成績	76
1 7.	中尾 一彦	TRAILによるIFNシグナル（抗ウイルス作用）の増強	81
1 8.	矢野 博久	PEG-IFN- α 2bの肝癌細胞の増殖抑制に関する研究	88

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

分冊（2/2）参照

IV. 研究成果の刊行物・別刷

分冊（2/2）参照

I. 総括研究報告

肝硬変に対する治療に関する研究

主任研究者 八橋 弘

国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター 治療研究部長

研究要旨 本研究では、ウイルス性肝硬変患者に対して、ウイルス駆除（B型肝炎ではウイルス増殖持続抑制）と発癌抑止の2つの治療目標を設定し、それぞれの目標に対する具体的な治療法の提示と治療指針の作成することで、わが国のウイルス性肝硬変患者の生命予後、QOLを改善させることを目指す。

830例のC型慢性肝炎、肝硬変症例のPegIFNとリバビリン併用治療例の治療中のHCV-RNA消失状況の検討では、F0-2症例に比較しF3-4の肝線維化進展例では治療中のウイルス排除率が有意に低い結果が得られた。現行の治療法の中で最も抗ウイルス効果が高いと言われるPegIFNとリバビリン併用療法を用いてもF3-4の線維化進展例、肝硬変症例ではウイルス排除が困難であることを明らかにした。

C型慢性肝炎、肝硬変症例に対するIFN治療効果のデータマイニング（Dm）解析（決定木法、RBF法）と統計解析の重回帰分析との3法での治療効果予測の比較検討結果から、3法の予測結果は相補的であり、重回帰分析以外にもDm（決定木法、RBF法）での予測式でも治療効果を推測できることを明らかにした。

C型肝炎IFN治療に関連する薬物応答性遺伝子のSNP解析をおこなうため、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針に則り、倫理委員会への申請作業をおこない、審査通過施設から採血、DNAの抽出後、パイロット的にSNP解析をおこなった。単独施設でのIFN治療症例120症例での269箇所のSNPパターンのDm解析結果から、IRF2、IFNAR2、MxAなどの3箇所のSNPの組み合わせにより具体的なウイルス駆除期待率の算出が可能であることを確認した。

in vivoの系で、IFNはPeg化することで抗腫瘍効果が増強することを確認した。

分担研究者

石橋 大海 長崎医療センター
古賀 満明 嬉野医療センター
袖山 健 中信松本病院
林 茂樹 災害医療センター
酒井 浩徳 九州医療センター
加藤 道夫 大阪医療センター
原田 英治 東京病院
竹崎 英一 呉医療センター

脇岡 泰三 大阪南医療センター
室 豊吉 大分医療センター
小松 達司 横浜医療センター
正木 尚彦 国立国際医療センター
足立 浩司 金沢医療センター
増本 陽秀 小倉病院
中尾 一彦 長崎大学
矢野 博久 久留米大学

研究協力者

大原 行雄	西札幌病院
千田 信之	仙台医療センター
小林 正和	中信松本病院
森本日出雄	金沢医療センター
結城 暢一	大阪医療センター
山下 晴弘	岡山医療センター
小田 修治	善通寺病院
島田 昌明	名古屋医療センター
山東 剛裕	京都医療センター
渡部 幸夫	相模原病院
中村 陽子	相模原病院
竿代 丈夫	西埼玉中央病院
斉藤 晃	西埼玉中央病院
田中 伸	東京医療センター
山本 哲夫	米子医療センター
杉 和洋	熊本医療センター
坂口 栄樹	関門医療センター
大黒 学	長崎医療センター
松本 武浩	長崎医療センター
長岡 進矢	長崎医療センター

A. 研究目的

わが国の肝硬変患者の約70~80%は、C型肝炎あるいはB型肝炎ウイルスの持続感染が原因である。わが国では、両肝炎ウイルス持続感染者における肝硬変や高度肝線維化進展者の比率が高く高齢でもあることから、諸外国に比較して発癌のリスクが高いことが特徴で深刻な問題となっている。

本研究では、ウイルス性肝硬変患者に対して、ウイルス駆除（B型肝炎ではウイルス増殖持続抑制）と発癌抑制の2つの治療目標を設定し、それぞれの目標に対する具体的な治療法の提示と治療指針を作成することで、最終的にはわが国のウイルス性肝硬変患者の生命予後、QOLを改善させることを目指す（図1）。

図1. 『肝硬変に対する治療に関する研究』の概要

研究目的:

ウイルス性肝硬変患者に対して、ウイルス駆除と発癌抑制の2つの治療目標を設定し、具体的な治療法を提示し治療指針を作成することを研究目的とする。

研究手法の特徴:

多施設共同研究 SNP解析 データマイニング(Dm) 症例解析 基礎研究

研究計画:

初年度:肝硬変患者でのウイルス駆除の問題点をDmで明らかにする。(F0-2 vs F3-4)
SNP解析の準備(倫理委員会、迅速審査、同意書、採血)
2年度:SNP解析、集計、アルゴリズムの作成(Dm)。
発癌抑制のプロトコル作成、治療開始(IFN少量長期、PegIFN)
3年度:解析、治療指針の作成。

B. 研究方法

本研究班では政策医療として既に組織が編成され活動をおこなっている国立病院機構内の肝疾患専門医療施設26施設を中心として多施設共同研究をおこなう。

B-1. 研究目標1: ウイルス性肝硬変患者に対するウイルス駆除、持続的ウイルス増殖抑制を治療目標とした治療法の開発

C型肝炎治療では、高齢の肝硬変患者に対して安全で効果的なウイルス駆除療法を提示するために、一般的な臨床パラメーターに加えて薬物応答性遺伝子のSNP情報も含めて解析をおこない、個々の患者の病状、病態に応じて、最適なウイルス駆除療法を選択する治療選択のアルゴリズムを作成する。多数の遺伝子SNP情報の解析手法としてはインベーターアッセイを用いて測定をおこない、臨床に関する情報およびSNPなどの遺伝子情報の解析手法としては人工知能として位置づけられているデータマイニングを用いる。高齢で肝予備能が低く、汎血球減少を示す肝硬変患者を治療対象とした場合での具体的なウイルス駆除率がデータマイニングを用いることで算出される。治療効果と副作用の兼ね合いでウイルス駆除が困難と判定された対象では、研究目標2である発癌抑制の治療法を選択する。

B型肝炎治療に関しては、ラミブジンの治療効果、薬剤耐性のYMDD変異株出現状況を明らかにするとともに、非代償性肝硬変患

者に対する抗ウイルス治療の治療効果、肝予備能の改善などを解析する。

B-2. 研究目標2：ウイルス性肝硬変患者に対する発癌抑止を治療目標とした治療法の開発

IFNによる抗腫瘍効果に関する基礎的検討結果から得られた成績をもとに、ウイルス性肝硬変患者に対する発癌抑止に最適なIFNの選択、投与法を検討し、治療プロトコルを作成して治療を開始する。治療期間中のAFPなどの腫瘍マーカーの動き、画像所見から薬剤投与中の発癌抑止期間を評価することで、本治療法の有効性を明らかにする。

B-3. SNP解析

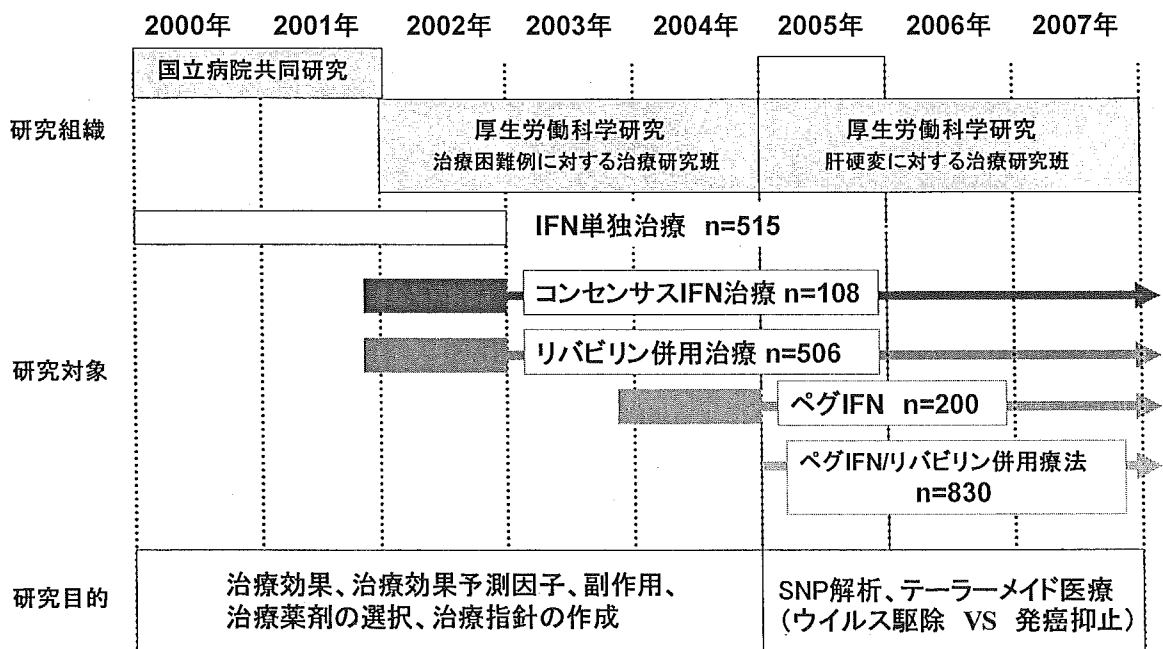
2000年～2002年の3年間に国立病院機構内の肝疾患専門医療施設26施設内で治療がおこなわれた約1129例のC型慢性肝炎患者（IFN単独治療例515例、コンセンサスIFN治療例108例、IFN α 2bとリバビリン併用治

療例506例）と2004年12月以後、PegIFNとリバビリン併用療法をおこなった830例のC型慢性肝炎患者に、ウイルス駆除に関わる薬物応答性遺伝子のSNP解析を開始する（図2）。PegIFNとリバビリン併用療法倫理委員会に研究計画を提出し、ヒトゲノムの倫理指針に準じて患者の同意を書面で得た上で、採血をおこないDNAの抽出をおこなう。大塚TRC研究所に委託してインベーターアッセイを用いてIFN治療効果に関連する遺伝子のSNPを測定する。その測定結果を日本IBMに委託してデータマイニング解析をおこなう。

B-4. 倫理面への配慮

ヒトゲノム、遺伝子解析に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針および申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定を遵守するとともに、倫理委員会に研究計画を提出し、承認を得た上で、研究を実施する。特にSNP解析に関して

図2. 国立病院機構内肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するIFN治療に関する共同研究の進行状況と今後の計画



H Yatsushashi, 長崎医療センター

は、全ての検体は、連結可能匿名化する。本研究の個人情報管理者は、患者検体採取後速やかに患者の個人識別情報を検体から取り除き、符号化・番号化による匿名化を行う。また、患者個人識別情報と検体との対応表は、独立の鍵が掛かる場所に厳重に保管する。被験者に理解を求め同意を得る方法：被験者各人に三省指針に基づいた説明文を用いて書面と口頭で説明し、文書による同意を得る。説明の具体的内容は以下のとおりである。

- ① 遺伝子の分析を行うこと
- ② 研究参加の任意性と撤回の自由
- ③ 研究目的
- ④ 研究方法
- ⑤ 研究計画書の開示
- ⑥ 試料提供者にもたらされる危険性および不利益
- ⑦ 個人情報の保護
- ⑧ 遺伝子解析結果の開示
- ⑨ 研究成果の公表

- ⑩ 研究から生じる知的財産権の帰属
- ⑪ 遺伝子解析研究終了後の試料等の取扱い方針
- ⑫ 費用負担に関する事項

C. 結果

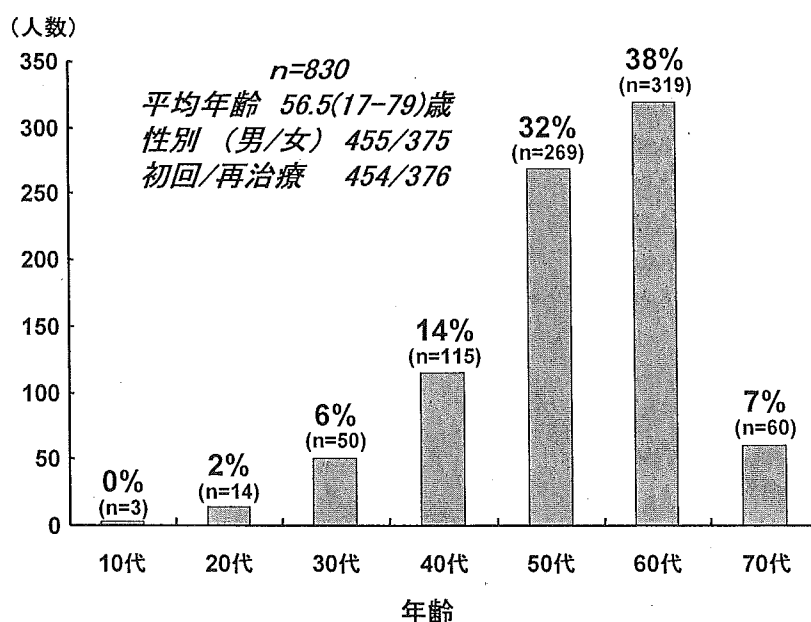
C-1. C型慢性肝炎、肝硬変に対するPegIFNとリバビリン併用療法治療成績

2004年12月から2005年12月の期間、本研究協力施設である国立病院機構内の肝疾患専門医療施設26施設において、830例のC型慢性肝炎、肝硬変症例に対してPegIFNとリバビリン併用療法が導入された。平均年齢は56.5歳（17～79歳）、性別では男性455例（55%）、女性375例（45%）。830例中初回治療は454例（55%）、再治療は376例（45%）（図3）。

治療前のウイルス量、HCV genotype分布は図4に示すとおりである。830例中630例に治療前に肝生検が施行され、F0-2は計433例（69%）、F3-4は197例（31%）で全対象例

No.	施設名	合計
1	大阪医療	195
2	長崎医療	92
3	九州医療	67
4	京都医療	55
5	呉医療	50
6	金沢医療	40
7	大阪南医療	35
8	東京	31
9	災害医療	31
10	熊本医療	31
11	大分医療	28
12	国際医療	28
13	小倉	27
14	横浜医療	23
15	西埼玉中央	21
16	仙台医療	15
17	中信松本	12
18	相模原	12
19	名古屋医療	10
20	嬉野医療	10
21	岡山医療	6
22	東京医療	6
23	米子医療	4
24	西札幌	1
25	普通寺	0
26	関門医療	—
合計		830

図3. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するPeg-IFN+Rib治療、施設別症例数と年齢別症例数の分布 (n=830) 2004年12月～2005年12月導入症例



の約3分の1の症例が肝線維化高度進展例であった(図5)。治療前PegIFN投与量の分布は、80 μ g投与331例(40%)、100 μ g投与317例(38%)であり、両投与群での合計は78%と多数を占めた(図6)。

HCV1b型で100KIU以上の高ウイルス症例において、治療経過中のHCV-RNA定性検査が施行された667例を対象に、(治療4週目、12週目、24週目)の陰性化率を算出すると、実測定値の陰性化率はそれぞれ12%、47%、

図5. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するPeg-IFN+Rib治療、肝線維化進展度の分布(n=830) 2004年12月~2005年12月導入症例

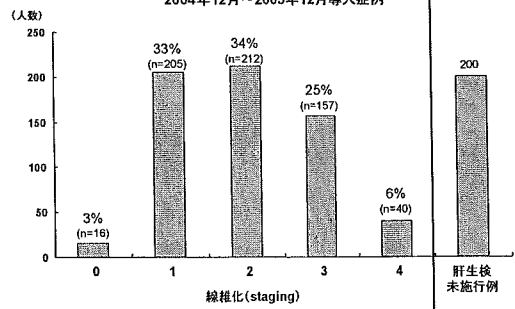


図4. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するPeg-IFN+Rib治療、初回治療、再治療例のウイルス因子の詳細(n=830) 2004年12月~2005年12月導入症例

	初回治療 (n=454)	再治療 (n=376)	計 (%) (n=830)
HCV-RNA量			
100KIU/ml以上	432 (96)	353 (95)	785 (95)
100KIU/ml未満	20 (4)	20 (5)	40 (5)
未測定	2	3	5
genotype			
1b	445 (98)	364 (97)	809 (97)
1b以外	4 (1)	10 (3)	14 (2)
判定不能	2 (0)	1 (0)	3 (0)
混合	3 (1)	1 (0)	4 (0)

図6. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するPeg-IFN+Rib治療(n=830) 2004年12月~2005年12月導入症例

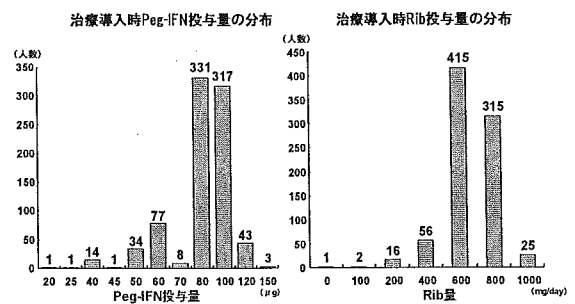
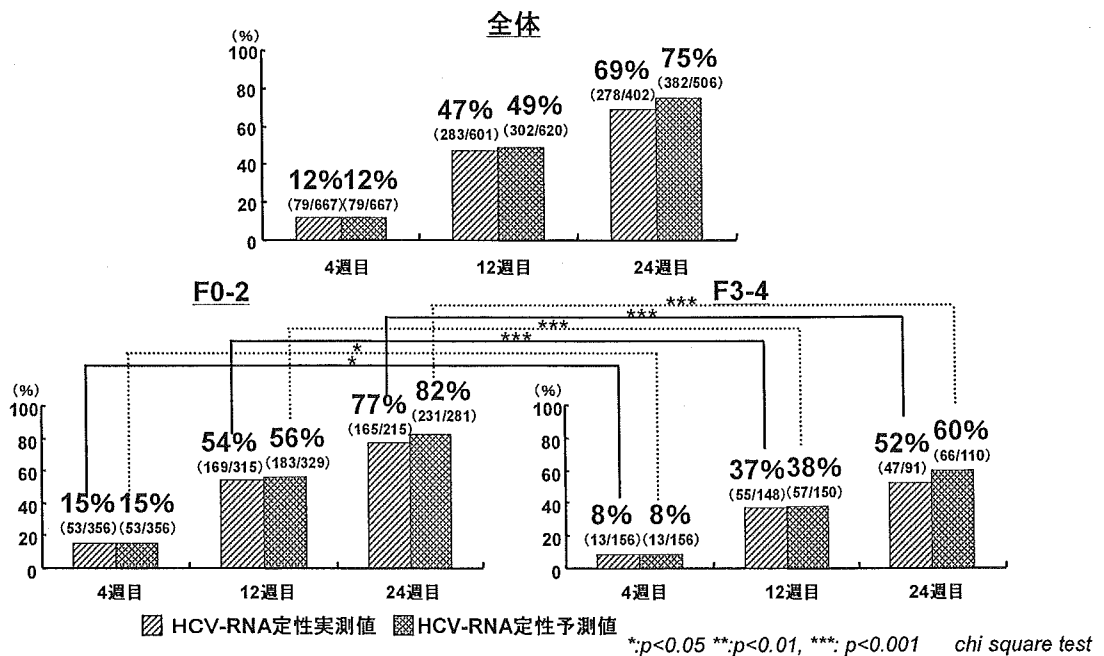


図7. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するPeg-IFN+Rib治療、1b・Highを対象とした集団全体及び肝線維化別(F0-1 vs F3-4)、治療中(治療開始4週目、12週目、24週目)のHCV-RNA(定性検査)陰性化率(n=667) 2004年12月~2005年12月導入症例



69%、定点ポイントで実測されていないも測定ポイント前後から推定したHCV-RNA定性検査陰性化率予測値では12%、49%、75%であった。

肝線維化進展度別 (F0-2 vs F3-4) にHCV-RNA陰性化率を求めると、実測値では、治療4週目 (15% vs 8% : P<0.05)、治療12週目 (54% vs 37% : P<0.001)、治療24週目 (77% vs 52% : P<0.001)、予測値で治療4週目 (15% vs 8% : P<0.05)、治療12週目 (56% vs 38% : P<0.001)、治療24週目 (82% vs 60% : P<0.001) で、どの測定ポイントにおいても、線維化進展例では、有意にHCV-RNA陰性化率が低値であった (図7)。

同対象例を (60未満と60歳以上) に区分して (治療4週目、12週目、24週目時点のHCV-RNA陰性化率を算出すると、実測値では、治療4週目 (14% vs 10% : NS)、治療12週目 (50% vs 43% : NS)、治療24週目 (73% vs 64% : P<0.05)、予測値で治療4週目 (14% vs 10% : NS)、治療12週目 (52% vs 45% : NS)、治療24週目 (79% vs 71% : P<0.05) であり、24週目の時点で60歳以上で有意にHCV-RNA陰性化率が低値であった (図8)。

PegIFNとリバビリン併用療法開発試験の成績では、治療中のHCV-RNA消失時期と治療効果との明確な相関関係が明確になっている (治療4週目までのHCV-RNA消失例では治癒率100%、12週目までは71%、24週目までは35%、24週目以後もHCV-RNA陽性では0%)。

表1に、HCV-RNA消失時期別の各種背景因子の特徴の比較検討結果を示す。女性、肝線維化高度進展例 (F3-4) において、HCV-RNA消失時期が遅延することが明らかとなった。

C-2. C型慢性肝炎IFN治療効果に関するデータマイニング解析 (重回帰分析、Dm決定木法、DmRBF法、3法での治療効果予測の比較)

データマイニング (Data mining : Dm) とは、過去のデータを分析し、その中から有効な規則性を発見して、重要な意思決定支援を促進する先進的情報解析システムである。従来の統計解析手法は、限られたサンプル数を用いて仮説を検証する方法であることから、網羅性、迅速性において難点があるも、Dmでは膨大なデータから網羅的に高速探索し、精緻な解析が可能である。本研究班では、集積した臨床データを、Dmを用いて分析することによりC型慢性肝炎IFN治療効果予測モデルの構築を決定木法とRBF (Radial Basis Function) の2つの手法で試みた。

対象は、2000年~2002年の3年間に国立病院機構内の肝疾患専門医療施設26施設内で治療がおこなわれた約1129例のC型慢性肝炎患者 (IFN単独治療例515例、コンセンサスIFN治療例108例、IFN α 2bとリバビリン併用治療例506例) のうち、治療前に肝組織検査を施行し、F (肝線維化) とA (炎症) の評価が可能であった916例である。説明変数として1. ウイルス量、2. HCVgenotype、3. IFN総投与量、4. 治療期間、5. 治療法、6. F (肝線維化)、7. A (炎症)、8. 初回治療か再治療か、9. 年齢、10. 性別の10因子を用いた。一方、治療終了後6ヶ月目の時点でアンプリコアHCV-RNA定性検査でHCV-RNA陰性をSVR : Sustained Viral Response (ウイルス学的著効)、それ以外をNon-SVRという2つの目的変数を設定した。Dm解析には、IBM Intelligent Minerを用いてクラス判別をおこなう決定木 (decision tree) 手法とRBF (Radial Basis Function) 法を用いて表現した。なお本解析業務は日本IBMに委託した。

図8. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するPeg-IFN+Rib治療、1b・Highを対象とした集団全体及び年齢別(60歳未満 vs 60歳以上)別、治療中(治療開始4週目、12週目、24週目)のHCV-RNA(定性検査)陰性化率(n=667) 2004年12月～2005年12月導入症例

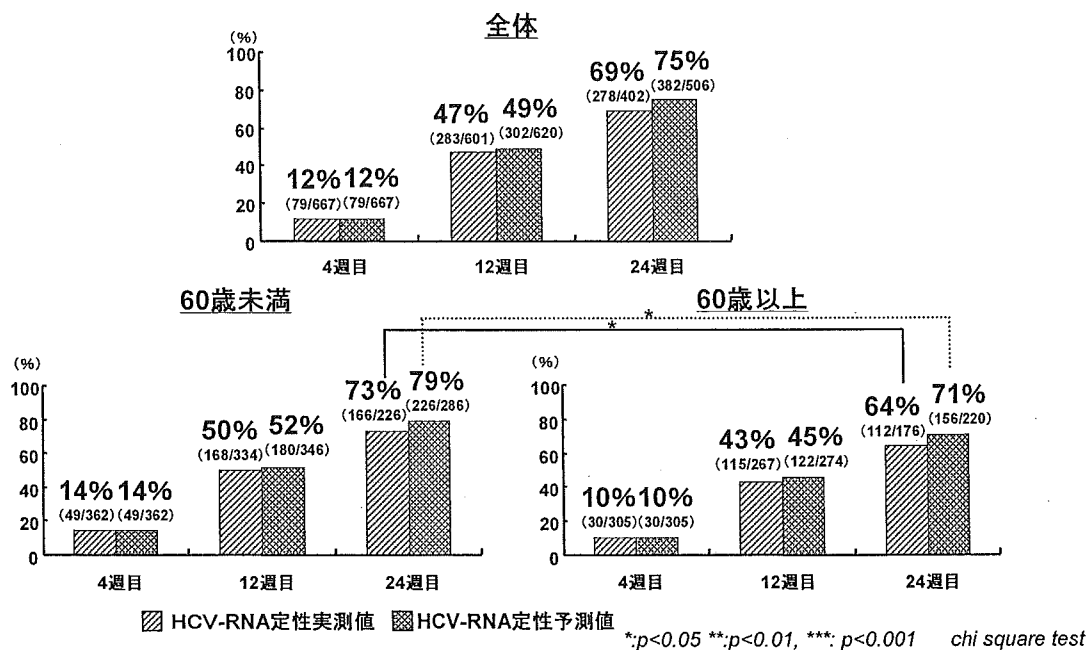
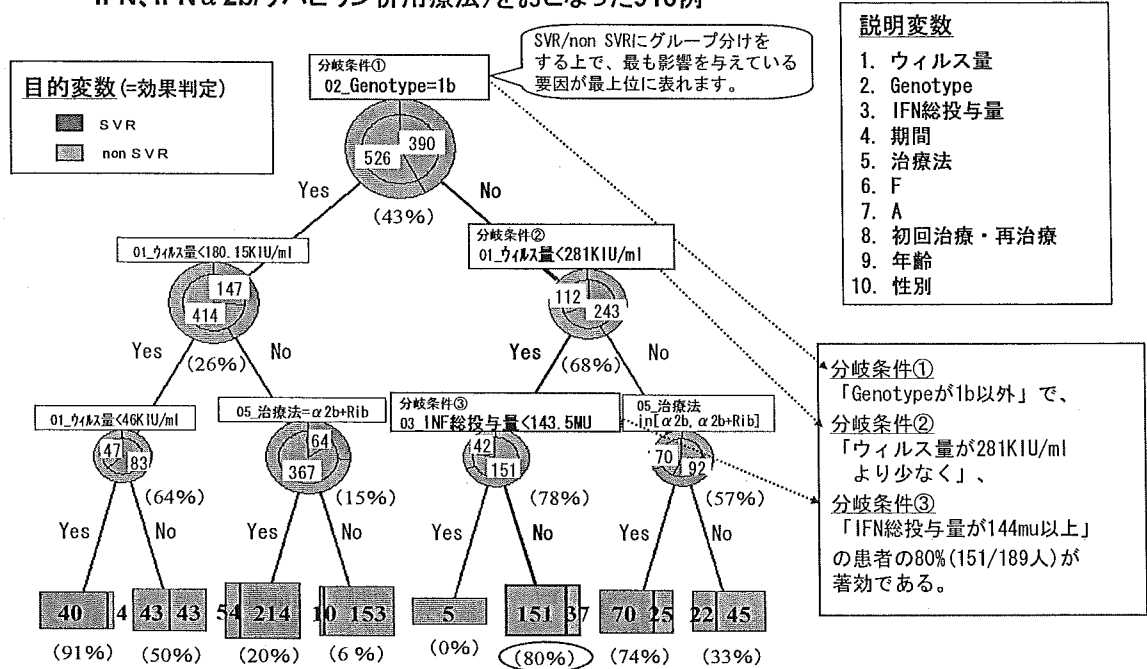


表1. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するPeg-IFN+Rib治療、1b・Highを対象とした各HCV-RNA(定性検査)陰性化時期別(4週、12週、24週)および24週目HCV-RNA陽性群の背景因子の特徴 (治療開始24週以上経過した対象例n=393) 2004年12月～2005年12月導入症例

	4週目(-) (n=47)	12週目(-) (n=151)	24週目(-) (n=81)	24週目(+) (n=114)
治療(初回:再)	22(47):25	85(56):66	47(58):34	53(46):61
性別(M:F)	31(66):16	92(61):59	36(44):45	63(46):51
平均年齢(歳)	55.4±13.2	55.3±10.5	57.2±9.5	57.5±10.5
年齢別(<40:50:60<)	14(30):13:20	40(26):48:63	12(15):33:36	22(19):35:57
開始時PEG-IFN量(μg)	91.1±14.3	89.7±15.2	84.3±19.6	84.1±17.5
開始時Rib量(mg/day)	706.4±124.1	692.1±140.7	666.7±134.2	661.4±119.4
線維化(F0-2:F3-4:)	28(74):10	89(75):29	47(81):11	47(55):39

*:p<0.05 **:p<0.01, ***: p<0.001 chi square test

図9. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するIFN治療成績のデータマイニング解析(決定木法)結果。治療前組織検査を施行しIFN治療(IFN単独、コンセンサスIFN、IFN α 2b/リバビリン併用療法)をおこなった916例



916例での決定木法を用いたDm解析結果、ウィルス駆除率 (SVR%) 算出のアルゴリズムを作成したものが図9である。HCV genotypeと治療前ウィルス量、IFNの総投与量、治療法の種類、IFN総投与量などが治療効果に及ぼす因子として抽出された。

次に同対象者をRBF (Radial Basis Function : 理論は図10に記載) を用いて解析した結果が図11である。916例は、RBFのアルゴリズムで自動的に8つのグループに群別され、それぞれの群での治療効果に関わる因子が表示されている。8つのグループではいずれもウィルス量が最もSVRに関わる重要な因子として抽出されているが、最もSVRが低い難治であるグループ8においては、4番目の因子としてF (肝線維化) が抽出されている。

最後に、この916例の同一データベースをもとに、重回帰分析、決定木法、RBF法の3法で治療効果予測式を算出し、それぞれの予測式から算出した理論値と実際値との違い、

SVR、nonSVRの治療効果予測値と実際の値との比較を3法との関係が明らかになるように表示したものが図12である。決定木法では916例中721例 (78.7%)、RBF法では916例中674例 (73.6%)、重回帰分析では916例中663例 (72.4%) の的中率であった。3法の予測が一致したC群では567例中495例の87.3%の的中率で最も高率であった。3法の予測式は相補的であること、重回帰分析以外にもDmによる決定木法、RBF法という未来予測式で治療効果を予測できることを明らかにした。

図10. RBF (Radial Basis Function) のアルゴリズム

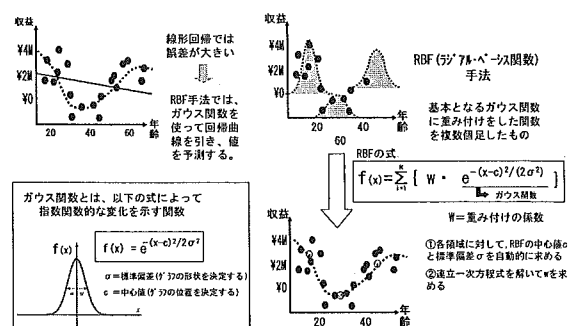


図11. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するIFN治療成績のデータマイニング解析(RBFモデル法)結果。治療前組織検査を施行しIFN治療(IFN単独、コンセンサスIFN、IFN α 2b/リバビリン併用療法)をおこなった916例

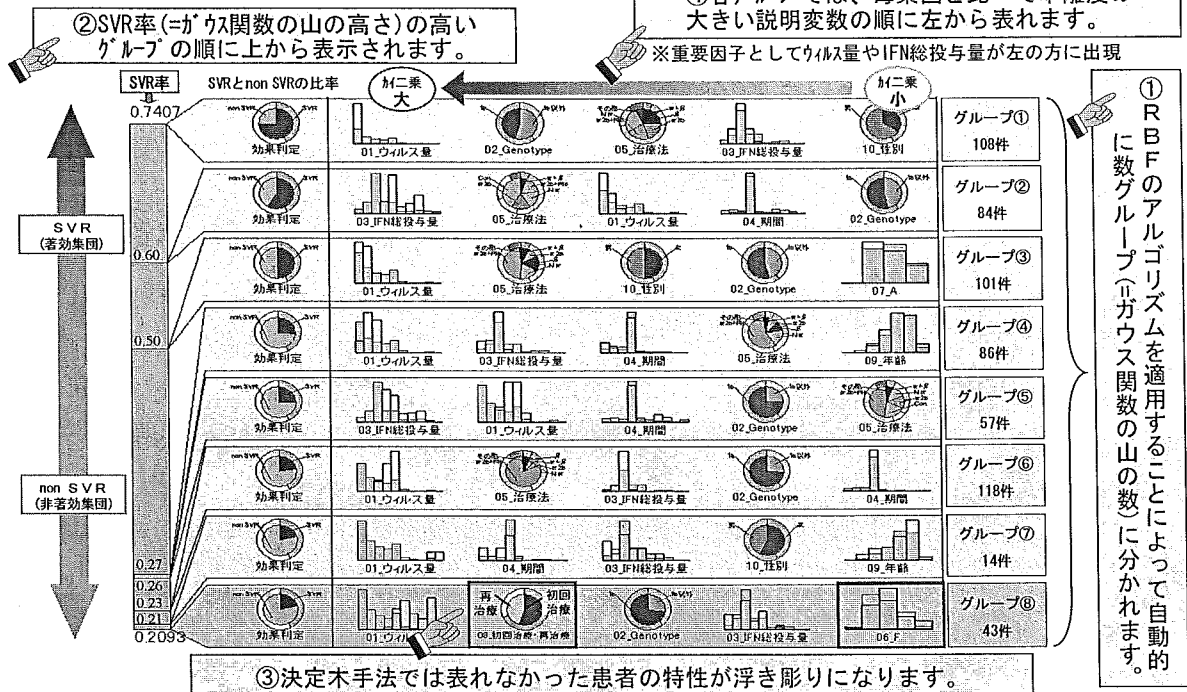
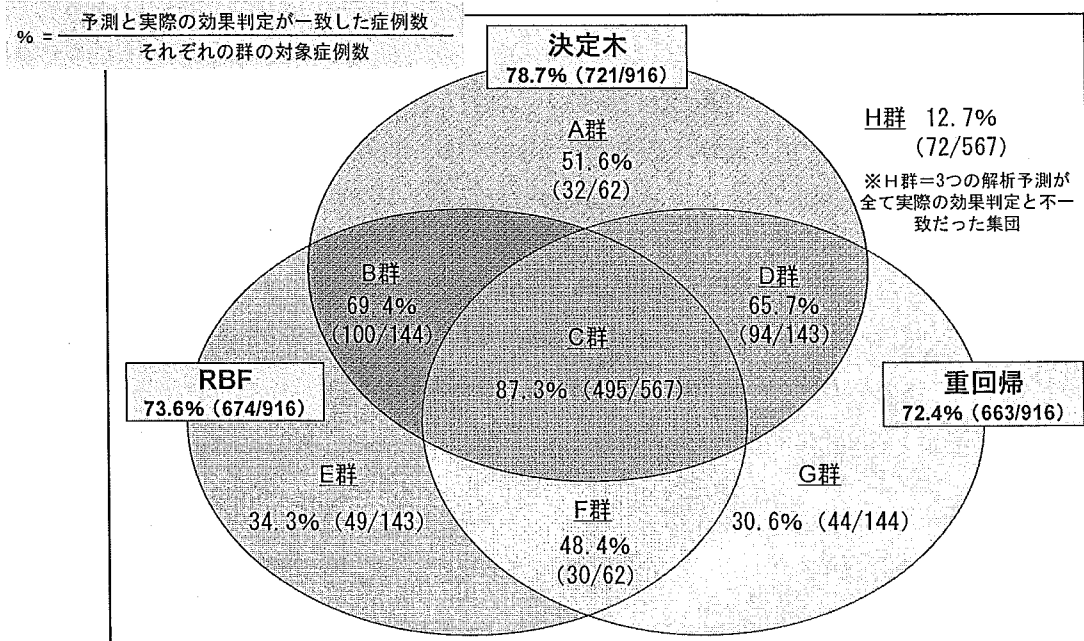


図12. 国立病院機構肝疾患専門医療26施設、C型慢性肝炎、肝硬変に対するIFN治療例の重回帰分析、データマイニング解析(決定木法とRBFモデル法)での治療効果予測的中率との関係。治療前組織検査を施行しIFN治療(IFN単独、コンセンサスIFN、IFN α 2b/リバビリン併用療法)をおこなった916例



C-3. C型慢性肝炎IFN治療関連遺伝子に関する網羅的探索研究

C型慢性肝炎のIFN治療効果に影響を及ぼす因子は、大きく、ウイルス因子（ウイルスの型と量）、薬剤因子（IFNの種類、投与量、投与期間、リバビリン併用の有無など）、宿主因子（患者の年齢、性、肝線維化の程度、薬剤感受性の遺伝的要因、個人の資質、遺伝多型：SNPなど）の3つの要素に分類される。

（図13）C型肝炎IFN治療効果に関して、ウイルス因子は極めて重要な因子であることは明らかとなっているも宿主因子に関しては断片的な解析がおこなわれているに過ぎない。今までにMxA、IL10、IRF1のプロモーター領域のSNPやハプロタイプ、IFNAR1（IFNレセプター）のマイクロサテライト配列がIFN治療効果に関係したと報告されているも、いずれも少数のSNPを統計学的手法で解析したものである。

今回IFN治療に関連する遺伝子マップからSNPを網羅的に探索し、Dmを用いてIFN治療関連遺伝子のネットワークの解明することを試み、120症例という少数例で、269という限られたSNP数、ゲノム情報ではあるも、C型慢性肝炎IFN治療関連遺伝子に関するSNPの組み合わせによって具体的な治療期待率が容易に算出可能であることを確認した。

対象は、長崎医療センターでIFN治療をおこなったC型慢性肝炎患者120例。ウイルス因子による治療効果の影響をできるだけ排

除するため、この120症例は全例治療前HCV-RNA量が100KIU/ml以下の低ウイルス症例を選択した。すなわち、ウイルス学的にはIFN治療効果が期待できるも、IFN単独治療でウイルス駆除に成功した著効（SVR）65例と、無効例（Non-SVR）の55例が対象である。IFN治療に関連する16遺伝子（IFN-AR1, IFN-AR2, JAK1, TYK2, JAK（CIS）, STAT1, STAT2, ISGF3G（IRF9）, IRF1, IRF2, TAP1, TAP2, LMP7, PKR, MxA, IL-10）の中から269箇所をSNPを同定し、インベダ法（大塚TRC研究所）及びダイレクトシーケンス法を用いて決定した。Dm解析は、IBM Intelligent Miner II Ver.8（日本IBM）を用いた。

統計解析結果では、単点解析ではIRF2（111, 115）、MxA（200, 304, 202）、IFNAR1（369, 355）が有意であった。多点解析として各染色体における全ての解析SNP間の連鎖不平衡係数（D', r²乗）の算出、連鎖不平衡解析ブロック内で推定されるハプロタイプの頻度分布比較解析では、IRF2（111-T/115-G, 111-C/115-T）をもつハプロタイプTG, CAがnonSVRで有意であった（表2）。SNPの組み合わせという観点で269個のSNPの組み合わせパターンを計算したところ、10の161乗の組み合わせパターンとなり、高だか269個という限られたSNP数の組み合わせ解析でも、統計学的手法を用いての情報処理は不可能であることが判明した。次にDmによる決定木法解析をおこない、図14

図13. C型慢性肝炎IFN治療効果に影響を及ぼす因子

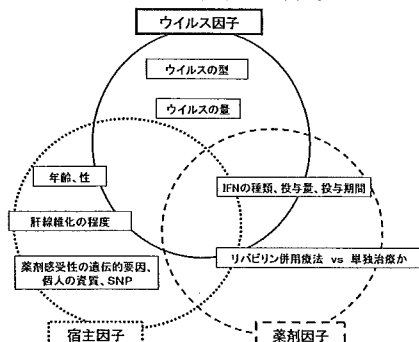
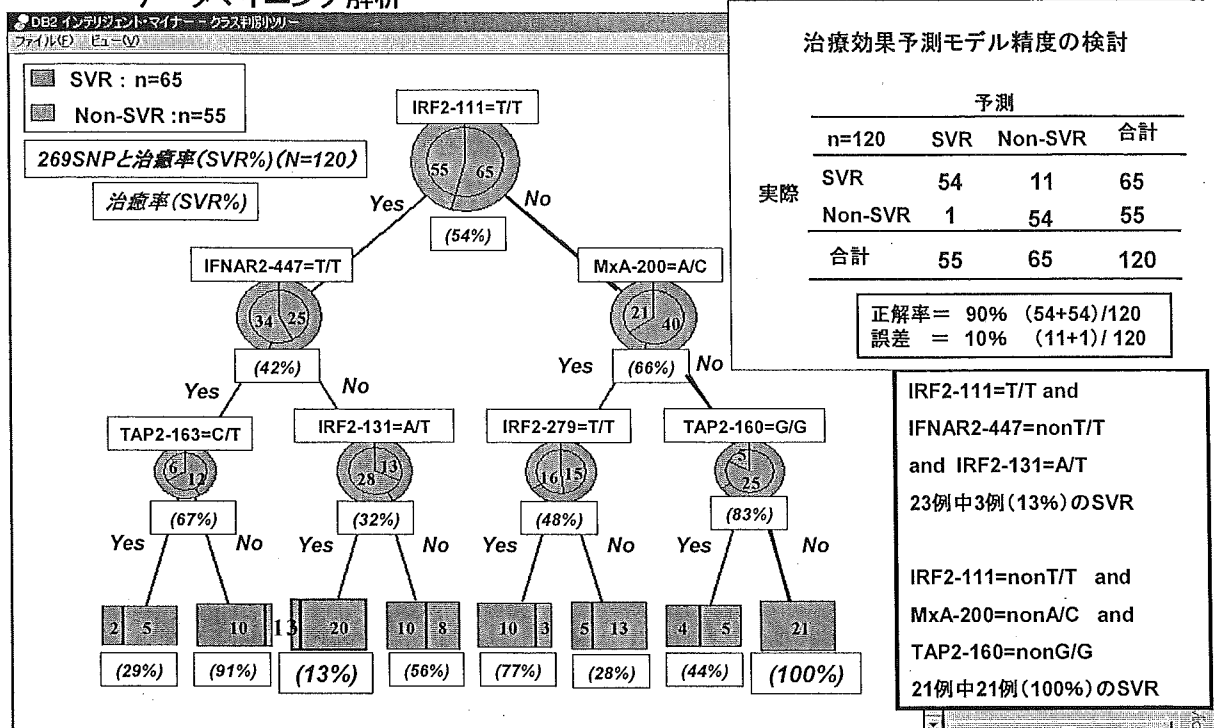


表2. IFN著効(SVR)群・無効(Non-SVR)群間での統計解析結果

単点解析(単変量解析)			P値<0.05,	
G.S.	position	P値	OR (95%CI)	
IRF2	111	intron	0.011	2.59 (1.24-5.42)
	115	intron	0.031	2.25 (1.07-4.75)
MxA	200	5'UTR	0.016	2.61 (1.18-5.74)
	304	5'flanking	0.044	2.22 (1.02-4.84)
	202	5'flanking	0.034	2.39 (1.08-5.28)
IFNAR1	369	intron	0.041	3.39 (1.00-11.5)
	355	intron	0.044	1.74 (1.01-2.99)
多点解析(各染色体における全ての解析SNP間の連鎖不平衡解析ブロック内で推定されるハプロタイプの頻度分布比較解析)				
IRF2	111/115	T/G vs others	0.021	1.93 (1.09-3.41)
		C/A vs others	0.031	2.03 (1.08-3.84)

図14. IFN治療に関する遺伝子多型(SNP)の組み合わせによる治療効果予測:
データマイニング解析



のようなアルゴリズムを作成することが可能であった。具体的には、RF2 (111-nonT/T)、MxA (200-nonA/C)、TAP2 (160-nonG/G)の3条件を満たすと21例中21例(100%)がSVR、IRF2 (111-T/T)、IFNAR2 (447-nonT/T)、IRF2 (131-A/T)、IFNAR2 (392-nonG/G)の4条件を満たすと23例中3例(13%)しかSVRにならなかった。Dm解析によって、3つないし4つのSNPの組み合わせで、100%近く治療効果が期待できる集団と、10%前後しか治療が期待できない集団に判別することが可能であった。

遺伝病とは異なり個々の遺伝子が形質に与える影響が弱い一般的な疾患でのSNP解析では多点解析が必須である。今までのSNP解析に関する研究は、主に疾患原因遺伝子を探索する目的で、数千人から数万人規模の集団を対象に、遺伝統計学的手法を用いて、ひとつの遺伝子を吊り上げ同定した後、その遺伝子の機能解析をおこなうというプロセスで研究が進められてきた。しかしながら薬剤

感受性の遺伝的要因、遺伝子ネットワークを解明し、治療効果を予測するためには、ひとつのSNPの発見やハプロタイプを見つけるだけでは不十分であり、多点解析をおこない、その情報のからみを解きほぐす、SNPパターンの組み合わせの解析が必要である。今回、Dmで情報解析することにより、SNPの組み合わせ解析が可能で、複数のSNP結果から具体的な治癒確率、薬剤感受性を算出することが可能であったことを確認した。

多施設多数症例でのC型肝炎IFN治療に関連する薬物応答性遺伝子のSNP解析をおこなうため、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針に則り、研究計画とゲノム採血の同意書を作成した。26の国立病院機構内肝疾患専門医療各施設での倫理委員会への研究の申請、承認への作業をおこなった。審査が通過した施設から順次、採血、DNAの抽出をおこないSNP解析を開始した。

2006年3月末の時点で、HCV1b型高ウイルス症例例に対するPegIFNとリバビリン併

用療法症例を中心としたSNP解析用のゲノム採血が400例において終了しており、今後2年間以内に本治療対象者で治療効果とSNPの組み合わせ解析をおこなう予定にしている。

C-4. 分担研究者 研究協力者の研究報告

石橋分担研究者（長崎医療センター）：C型慢性肝炎、肝硬変に対するPegIFNとリバビリン併用療法の治療効果、副作用の実態およびそれらに関する因子を明らかにした。

古賀分担研究者（嬉野医療センター）：B型慢性肝炎、肝硬変に対するラミブジン、アデホビル、IFNとラミブジン併用などの各種治療法の治療効果を明らかにした。

袖山分担研究者・小林研究協力者（中信松本病院）：B型慢性肝炎、肝硬変に対するラミブジン治療例の自然経過、肝発癌状況に検討し、肝発ガン抑止と本薬剤での長期間のHBV増殖抑制効果との関連を明らかにした。

林分担研究者（災害医療センター）：一次調査で肝細胞癌症例の全国調査結果をおこない、予後が以前より改善していることと、施設間で予後の格差が存在すること等の問題点を明らかにした。今後二次調査をおこなうことで不明点を明らかにする予定とのことである。

酒井分担研究者（九州医療センター）：C型慢性肝炎、肝硬変に対するIFN単独療法、リバビリン併用療法、PegIFNとリバビリン併用療法の治療の実態、副作用を詳細に検討し、線維化進展例では、SVR率が低下することを明らかにした。

加藤分担研究者（大阪医療センター）：C型慢性肝炎、肝硬変に対するPegIFNとリバビリン併用療法の治療効果予測法として、治療早期のHCV-RNA量の減衰の程度を定量化し評価する0-2ratio 0-4ratioについて提唱、その解析結果から線維化進展例でのSVR率の低下等を推察した。

原田分担研究者（東京病院）：C型肝硬変に対するIFN治療効果を検討し、IFN治療例での肝発癌の抑止効果、肝疾患関連死亡の低下などを報告し、C型肝硬変患者に対するIFN治療は予後を改善することを明らかにした。

竹崎分担研究者（呉医療センター）：C型慢性肝炎、肝硬変に対するPegIFNとリバビリン併用療法の治療効果、副作用、治療中断など治療の実態について詳細に検討した。F3/4症例でのHCV-RNA陰性化遅延の実態を明らかにした。

脇岡分担研究者（大阪南医療センター）：1. IFN治療効果と肝発癌時の肝予備能およびその長期予後との関連を検討し、IFN治療SVR例では肝予備能は良いも生存期間には有意な差が見られなかったことを報告した。

2. C型慢性肝炎、肝硬変に対するPegIFNとリバビリン併用療法の治療効果予測について詳細に検討をおこない、SNP解析の意義についても言及した。

3. 肝癌RFA治療後の異所再発に関わる予測因子について検討し、効果的再発予防策の必要性を明らかにした。

室分担研究者（大分医療センター）：C型慢性肝炎、肝硬変に対する部分的脾動脈塞栓術後（PSE）のIFN治療効果について検討し、PSEにより血球減少例においてもIFNが投与可能となることから、PSEは線維化進行例に対するIFN治療の補助的手段として有用であることを明らかにした。

小松分担研究者（横浜医療センター）：C型慢性肝炎、肝硬変に対するPegIFNとリバビリン併用療法の治療の実態、治療効果、副作用を詳細に検討し、線維化進展例では、SVR率が低下することを明らかにした。

正木分担研究者（国際医療センター）：C型慢性肝炎、肝硬変に対するPegIFNとリバビリン併用療法の治療効果をEVR（early virological response）の観点から評価し、血

小板数がEVRの規定因子であることを明らかにした。

足立分担研究者（金沢医療センター）：B型慢性肝炎、肝硬変に対するラミブジン治療例を肝線維化進展度別に抗ウイルス効果、YMDD変異ウイルス出現状況を詳細に検討した。

増本分担研究者（小倉病院）：B型慢性肝炎、肝硬変に対するラミブジン治療例の長期経過、肝硬変例での肝予備能の改善状況を明らかにした。

中尾分担研究者（長崎大学）：TRAIL はIFN-receptor の発現増強を介して、IFN の抗ウイルス活性を促進する可能性を明らかにした。

矢野分担研究者（久留米大学）：PegIFN α 2bの肝癌細胞の増殖抑制効果についてin vitro、in vivoで検討した。IFNはPeg化することでin vivoにおいて抗腫瘍効果が増強したことから、PegIFN α 2b臨床投与量で、肝癌の発生、再発予防効果が期待できることを明らかにした。

D. 結論

830例のC型慢性肝炎、肝硬変症例のPegIFNとリバビリン併用治療例の治療中のHCV-RNA消失状況の検討では、F0-2症例に比較しF3-4の肝線維化進展例では治療中のウイルス排除率が有意に低い結果が得られた。現行の治療法の中で最も抗ウイルス効果が高いと言われるPegIFNとリバビリン併用療法を用いてもF3-4の線維化進展例、肝硬変症例ではウイルス排除が困難であることを明らかにした。

C型慢性肝炎、肝硬変症例に対するIFN治療効果のデータマイニング（Dm）解析（決定木法、RBF法）と統計解析の重回帰分析との3法での治療効果予測の比較検討結果から、3法の予測結果は相補的であり、重回帰分析以外にもDm（決定木法、RBF法）での予測

式でも治療効果を推測できることを明らかにした。

C型肝炎IFN治療に関連する薬物応答性遺伝子のSNP解析をおこなうため、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針に則り、倫理委員会への申請作業をおこない、審査通過施設から採血、DNAの抽出後、パイロット的にSNP解析をおこなった。単独施設でのIFN治療症例120症例での269箇所のSNPパターンのDm解析結果から、IRF2、IFNAR2、MxAなどの3箇所のSNPの組み合わせにより具体的なウイルス駆除期待率の算出が可能であることを確認した。

in vivoの系で、IFNはPeg化することで抗腫瘍効果が増強することを確認した。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 八橋 弘. インターフェロンの治療効果予測—SNPとデータマイニングを用いた解析. 肝臓 46(10) : 599-603, 2005
- 2) 福田実可, 八橋 弘, 矢野公士, 大黒 学, 石橋大海, 竹崎英一, 肱岡泰三, 酒井浩徳, 室 豊吉, 正木尚彦, 小松達司, 森本日出雄, 竿代丈夫, 増本陽秀, 袖山 健, 島田昌明, 山東剛裕, 渡部幸夫, 千田信之, 大原行雄, 山下晴弘, 原田英治. 高感度HCV-Core抗原定量試薬の基礎的検討と臨床的有用性. 医学と薬学 54(5) : 677-682, 2005
- 3) Taura N, Yatsunami H, Hamasaki K, Nakao K, Daikoku M, Ueki T, Yano K, Matsumoto T, Ishibashi H, Eguchi K. Increasing hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma mortality and aging: Long term trends in Japan. Hepatol Res. 34:130-134, 2006

- 4) Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K, HBV Core-Related Antigen Study Group. Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance. *Liver International*. 26:90-96, 2006
- 5) Tien LT, Ito M, Nakao M, Niino D, Serik M, Nakashima M, Wen CY, Yatsuhashi H, Ishibashi H. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 11(16):2398-2401, 2005
- 6) Michitaka K, Horiike N, Chen Y, Yatsuhashi H, Yano M, Kojima N, Ohkubo K, Tanaka Y, Yamamoto K, Ohno N, Onji M. Infectious source factors affecting the severity of sexually transmitted acute hepatitis due to hepatitis B virus genotype C. *Intervirolgy*. 48(2-3):112-119, 2005
- 7) Ikeda M, Fujiyama S, Tanaka M, Sata M, Ide T, Yatsuhashi H, Watanabe H. Risk factors for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C after sustained response to interferon. *J Gastroenterol*. 40(2):148-156, 2005
- 8) Jutavijittum P, Jiviriyawat Y, Yousukh A, Hayashi S, Toriyama K. Evaluation of a hepatitis B vaccination program in Chiang Mai, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 36(1):207-212, 2005
- 9) Nakamuta M, Kotoh K, Tanabe Y, Kajiwara E, Shimono J, Masumoto A, Maruyama T, Furusho N, Nomura H, Sakai H, Takahashi K, Azuma K, Shimoda S, Enjoji M, Hayashi J. Body surface area is an independent factor contributing to the effects of lamivudine treatment. *Hepatol. Res*. 31:13-17, 2005
- 10) Kotoh K, Nakamuta M, Fukushima M, Matsuzaki C, Enjoji M, Sakai H, Nawata H. High relative fat-free mass is important for maintaining serum albumin levels in patients with compensated liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 11:1356-1360, 2005
- 11) Kotoh K, Nakamuta M, Morizono S, Kohjima M, Arimura E, Fukushima M, Enjoji M, Sakai H, Nawata H. A multi-step, incremental expansion method for radio frequency ablation: optimization of the procedure to prevent increases in intra-tumor pressure and to reduce the ablation time. *Liver Int*. 25:542-547, 2005
- 12) Takeshita M, Sakai H, Okamura S, Oshiro Y, Higaki K, Nakashima O, Uike N, Yamamoto I, Kinjo M, Matsubara F. Splenic large B-cell lymphoma in patients with hepatitis C virus infection. *Human Pathology*. 36:878-885, 2005
- 13) 加藤道夫. アデホビル. *臨牀消化器内科*. 20 : 613-616, 2005
- 14) 加藤道夫. B型慢性肝炎治療の最前線 インターフェロン療法. *総合臨牀*. 54(3) : 541-547, 2005
- 15) Yuki N, Matsumoto S, Tadokoro K, Mochizuki K, Kato M, Yamaguchi T. Significance of liver negative-strand HCV RNA quantitation in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 44:302-309, 2006

- 16) 加藤道夫. B型慢性肝炎の病態をどう把握し, 治療方針を立てるか?. *Medical Practice*. 23(1) : 51-55, 2006
- 17) Kamitsukasa H, Harada H, Tanaka H, Yagura M, Tokita H, Ohbayashi A. Late liver-related mortality from complications of trans fusion-acquired hepatitis C. *Hepatology*. 41(4):819-825, 2005
- 18) Tokita H, Fukui H, Tanaka A, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Okamoto H. Risk factors for the development of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C who achieved a sustained virological response to interferon therapy. *J of Gastroenterol Hepatol*. 20:752-758, 2005
- 19) Yagura M, Tanaka A, Tokita H, Kamitsukasa H, Harada H. Factors regarding increase of platelet counts in chronic hepatitis C patients with sustained virological response to interferon — Relation to serum thrombopoietin levels. *Hepatol Res*. 33:211-215, 2005
- 20) 前出幸子, 森下慶一, 岩村国博, 高山敬子, 塚田百合子, 岸野真衣子, 清水 健, 松島昭三, 小松達司, 笠木陽子. ペグインターフェロン α 2a 導入後早期に Basedow 病を発症した C 型慢性肝炎の 1 例. *日内会誌*. 94 (12) : 2600-2602, 2005
- 21) Sawada K, Masaki N, Hayashi S, Zeniya M, Ishikawa T, Takahashi H, Ohnishi K, Fukunaga K, Hara N, Yamamoto T, Hada T, Toda G. Immunomodulatory effects of selective leucocytapheresis as a new adjunct to interferon-alpha2b plus ribavirin combination therapy: a prospective study in patients with high plasma HCV viraemia. *J Viral Hepatitis*. 12(3):274-282, 2005
- 22) Nakajima A, Usui M, Huy TT, Hlaing NK, Masaki N, Sata T, Abe K. Full-length sequence of Hepatitis B virus belonging to genotype H identified in a Japanese patient with chronic hepatitis. *Jpn J Infect Dis*. 58:244-246, 2005
- 23) Taura N, Hamasaki K, Nakao K, Ichikawa T, Nishimura D, Goto T, Fukuta M, Kawashimo H, Motoyoshi Y, Shibata H, Eguchi K. Clinical benefits of hepato cellular carcinoma surveillance: a single-center, hospital-based study. *Oncol Rep*. 14:999-1003, 2005
- 24) Hayashi T, Nakao K, Nagayama Y, Saitoh O, Ichikawa T, Ishikawa H, Hamasaki K, Eguchi K, Ishii N. Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic cells elicits effective antitumor immunity in murine hepatoma models. *Int J Oncol*. 26:1313-1319, 2005
- 25) Ichikawa T, Nakao K, Hamasaki K, Ohkubo K, Toriyama K, Eguchi K. An autopsy case of acute pancreatitis with a high serum IgG4 complicated by amyloidosis and rheuma toid arthritis. *World J Gastroenterol*. 11:2032-2034, 2005
- 26) Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, Yano K, Nagaoka S, Matsumoto T, Nakao K, Hamasaki K, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection — association between TGF β 1 polymorphisms and hepatocellular

- carcinoma. J Hepatol. 42:505-510, 2005
- 27) Arima Y, Matsueda S, Yano H, Harada M, Itoh K. Parathyroid hormone-related protein as a common target molecule in specific immunotherapy for a wide variety of tumor types. Int J Oncol. 27(4):981-988, 2005
- 28) Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, Nishida N, Takemoto Y, Kojiro S, Kojiro M. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues. Oncol Rep. 13(6):1043-1048, 2005
- 29) Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Ishizaki H, Kojiro M. Expression and activation of apoptosis-related molecules involved in interferon- α -mediated apoptosis in human liver cancer cells. Int J Oncol. 26(6):1645-1652, 2005
- 30) 伊与田賢也, 結城暢一, 山本佳司, 加藤道夫. 消化器3 ウイルス性肝炎 急性肝炎の診断と治療 (各論) : (2) B型急性肝炎とB型慢性肝炎急性増悪. 最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 27. 最新医学社. 2005. 80-87

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。