

Fig. 1. Clinical course of hepatitis C patients. Changes in HCV RNA titer (broken line with open square), ALT level (black line with open circle) and HCV antibodies (– or +) for each patient. Numbers 1–3 in open circles indicate DNA sequencing points. In acute patients **A** and **B**, time point 1 represents onset by transfusion. In chronic patients **C** and **D**, time point 1 represents first medical examination. In patient **E**, time point 1 represents five months after first medical examination. *Acute*: acute HCV infection; *CH*: chronic HCV infection

were quantified using competitive PCR assay [30] in which cloned DNA (with a 15-bp deletion in the middle portion) used as a competitor [29].

Nucleotide sequence analysis in E1/E2 region

Nucleotide sequences for the E1/E2 region were analyzed according to direct DNA sequencing methods for PCR products using λ exonuclease (Gibco-BRL, Rockville, MD). HCV genome was extracted using AGPC methods [4], then amplified by reverse transcriptase and nested-PCR from serum for overlapping regions using two sets of primer pairs. PCR primers and amplified regions utilized for each patient are listed in Table 2. The second PCR product which was amplified by 5'-phosphorylated primer. PCR products were purified by 3% Nusieve 3:1 agarose gel electrophoresis (FMC BioProducts, Rockland, ME). One to four units of λ exonuclease was added to purified PCR products, including 67 mM glycine-KOH (pH 9.4) and 2.5 mM $MgCl_2$, and incubated at 37 °C for 1 h to form single-stranded DNA. Reaction mixtures were precipitated with ethanol and dried for DNA sequencing. Aliquoted DNA fragments were used for identification of nucleotide sequences in the E1/E2 region [27]. Nucleotide sequences of the E1/E2 region were determined for all five patients during disease progression. Characterization of nucleotide sequences and phylogenetic analyses of HVR-1 were performed using GENETYX version 10 software (Software Development, Tokyo, Japan). The phylogenetic tree for HVR-1 was constructed using the neighbor-joining (NJ) method [26].

Table 2. List of primer sequences for PCR of the HCV genome

Patients (Point*) [nt no.**]	Primer name	sequence
A (1, 3) [618–1265]	1 st sense; (a)	5'-TGGGCAGGATGGCTCCTGTCN-3'
	1 st anti-sense; (b)	5'-TAGATTGAGCAATTGCAATCTTGN-3'
	2 nd sense; (c)	5'-CCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTN-3'
[848–1265]	2 nd anti-sense; (b)	5'-TAGATTGAGCAATTGCAATCTTGN-3'
A (2), B [618–1385]	1 st sense; (a)	5'-TGGGCAGGATGGCTCCTGTCN-3'
	1 st anti-sense; (d)	5'-GCCACCATGTCCACGACAGCTTGGTGG-3'
	2 nd sense; (e)	5'-TGGTAAGGTCATCGATAACCCACACN-3'
[697–1365]	2 nd anti-sense; (f)	5'-TTGTGGGATCCGGAGTAACTGCGACAC-3'
A, C [618–1385]	1 st sense; (a)	5'-TGGGCAGGATGGCTCCTGTCN-3'
	1 st anti-sense; (d)	5'-GCCACCATGTCCACGACAGCTTGGTGG-3'
	2 nd sense; (c)	5'-CCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTN-3'
[848–1365]	2 nd anti-sense; (f)	5'-TTGTGGGATCCGGAGTAACTGCGACAC-3'
D-2a, E [618–1387]	1 st sense; (a)	5'-TGGGCAGGATGGCTCCTGTCN-3'
	1 st anti-sense; (p)	5'-CTAATGATGTCTATGATGACCTCGGGAACG-3'
	2 nd sense; (c)	5'-CCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTN-3'
[848–1357]	2 nd anti-sense; (q)	5'-CGCATCACGTACGCCAGAATCATGG-3'
D-1b [1290–1867]	1 st sense; (h)	5'-ATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTC-3'
	1 st anti-sense; (i)	5'-TGAAACAATACACTGGACCACACAC-3'
	2 nd sense; (j)	5'-ATTCCATGGTGGGAACTGGGCTAA-3'
[1424–1813]	2 nd anti-sense; (k)	5'-TAGGTGCGTAGTGCCAGCAATAAGG-3'
B [1243–1887]	1 st sense; (l)	5'-CAAGATTGCAATTGCTCAATCTAN-3'
	1 st anti-sense; (m)	5'-ACTACAACAGGGCTCGGAGTGAAN-3'
	2 nd sense; (n)	5'-ATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTCN-3'
[1291–1867]	2 nd anti-sense; (o)	5'-TGAAGCAATACACTGGACCACACACN-3'
D-2a [1243–1887]	1 st sense; (l)	5'-CAAGATTGCAATTGCTCAATCTAN-3'
	1 st anti-sense; (m)	5'-ACTACAACAGGGCTCGGAGTGAAN-3'
	2 nd sense; (l)	5'-CAAGATTGCAATTGCTCAATCTAN-3'
[1243–1867]	2 nd anti-sense; (o)	5'-TGAAGCAATACACTGGACCACACACN-3'
A, C, E [1243–1867]	1 st sense; (l)	5'-CAAGATTGCAATTGCTCAATCTAN-3'
	1 st anti-sense; (i)	5'-TGAAACAATACACTGGACCACACAC-3'
	2 nd sense; (l)	5'-CAAGATTGCAATTGCTCAATCTAN-3'
[1243–1813]	2 nd anti-sense; (k)	5'-TAGGTGCGTAGTGCCAGCAATAAGG-3'

*Point, point of analysis; **nt no., nucleotide number on HC-R6, accession no. AY045702

Protein structure and amino acid substitution speed analyses in E1/E2 region

The a.a. sequence of the E1/E2 region was deduced from corresponding nucleotide sequences for all five patients. Protein structural analyses (hydrophobic profile, antigenic index and surface probability) were performed using MacVector sequence analysis software (International Biotechnologies, New Haven, CT). Protein secondary structure (Chou-Fas) was determined using GENETYX version 10 software (Software Development). Amino acid substitution speed was analyzed for HVR-1 (27 a.a.), HVR-2 (7 or 9 a.a.), another region of

Table 3. Reactivities of patient sera to HVR-1 peptides

	HVR peptide			
	Point:	1	2	3
Patient C				
Serum:				
1		—	—	—
Point: 2		—	—	—
3		—	—	—
Patient E				
Serum:				
1		+	+	+
Point: 2		+	+	+
3		+	+	+
Patient point	HVR-1 peptide sequences			
C-1	HTHVIGGAQTQTTGSFASLFTPGASQK			
C-2	RTHVIGGVQTQTTGSLASLFTPGASQK			
C-3	RTHVTGGVQSRITGSLVSLFTPGASQK			
E-1	STHTIGGCTARSAAGFTRLFTQGARQN			
E-2	STHTIGGSTARSAAGFTRLFTQGARQN			
E-3	STHTVGGSTARSAAGFTKLFTRGAHQN			

E2 (between HVR-1 and HVR-2; 63 a.a.) and E1 as the monthly rate of a.a. substitutions per site (%) between each point during disease progression (points 1–3; Fig. 1).

Test of host immune response to HVR-1 peptide

Synthetic peptides of HVR-1 for patients C and E were synthesized for each point in the clinical course (points 1–3; Fig. 1, Table 3). Peptides were tested using ELISA to characterize host immune responses to HVR-1 during chronic infection.

Results

Characterization of HCV-RNA, anti-HCV antibody and ALT levels in acute and chronic infection of hepatitis C virus

To clarify the mechanisms of genetic variation during persistent HCV infection, 5 patients were retrospectively analyzed (Table 1, Fig. 1). Patients A and B displayed acute infection with HCV genotype 1b, with progression from first phase of acute infection to chronic infection, and persistent viremia (Fig. 1). In the first phase of acute infection, antibody to HCV became positive (after point 1; Fig. 1). In patient A, HCV-RNA and ALT levels in serum decreased immediately after infection (point 1 to 2; Fig. 1), then elevated in the second phase of acute infection (point 2 to 3; Fig. 1). In patient B, HCV-RNA and ALT levels in serum decreased immediately

after infection, with an elevation of HCV-RNA levels occurring only in the second phase of acute infection (point 2 to 3; Fig. 1). Patients C, D and E displayed chronic hepatitis and persistent infection of HCV. Patient C was infected with genotype 1b, Patient E was infected with genotype 2a, and Patient D displayed co-infection with genotypes 1b and 2a (Table 1). In Figure 1, quantity of HCV-RNA in patient D indicates combined total RNA for both genotypes. These three patients displayed continuously high levels of ALT for more than six months after first medical examination and did not display marked changes in HCV-RNA levels (points 1–3; Fig. 1). A peak in ALT value was detected between points 2 and 3 for patients C and D, while elevation of ALT values was detected between points 2 and 3 for patient E.

Nucleotide sequence variation and patient-specific nucleotide sequence in E1/E2 region during clinical course of hepatitis C

To clarify the predominant sequence of E1/E2 region during progression of hepatitis C, 5 patients (2 patients with acute hepatitis, 3 patients with chronic hepatitis) were retrospectively selected and sequences (nucleotides 620 ~ 1867; Table 2) from the sera of these patients were analyzed at three points (points 1–3; Fig. 1) using direct DNA sequencing methods as described. Analyzed HCV DNA sequences of the E1/E2 region for each patient were registered to Genbank (accession numbers AB107929–AB107949). Alignment of nucleotide sequences on one-third of the E2 region (nucleotide 1492 ~ 1785) is indicated in Fig. 2. Sequences categorized as patient-specific conserved nucleotide sequences displayed the following characteristics: 1) identical nucleotide sequences at each of the three points; 2) sequences that are not conserved within the same genotypes (Fig. 2A). Consistent with previous results [29], numerous nucleotide sequence variations in HVR-1 and 2 were identified in these HCV isolates from acute and chronic infection patients. However, patient-specific conserved nucleotide sequences were observed in this E2 region even within HVR-1 and -2 for each patient (boxed region; Fig. 2A). In the E1 region, patient-specific conserved nucleotide sequences were also observed in the five patients (data not shown).

Sequences categorized as substituted nucleotide sequences displayed (Fig. 2B). Substituted nucleotide sequences were present in this E1/E2 region for all 5 patients during the clinical course of infection.

Amino acid sequence variations in the E1/E2 protein region during the clinical course of hepatitis C

Deduced amino acid sequences of the E1/E2 region (a.a. 192 ~ 480) were compared in 5 patients (2 acute patients, 3 chronic patients) at points 1–3 (Fig. 3). Sequences categorized as patient-specific amino acid sequences displayed the same characteristics as those of patient-specific nucleotide sequences. Variations in a.a. sequence were particularly concentrated in HVR-1 and -2 for HCV genotype 1b isolates (patients A–C and 1b isolate from patient D; Fig. 3) and in HVR-1 alone

for HCV genotype 2a isolates (patient E and 2a isolate from patient D; Fig. 3) during the clinical course of infection. Although patient-specific conserved amino acid sequences were present in this E1/E2 region for all 5 patients during the clinical course of infection, the impact was not as strong as that of patient-specific conserved nucleotide sequences (Fig. 2).

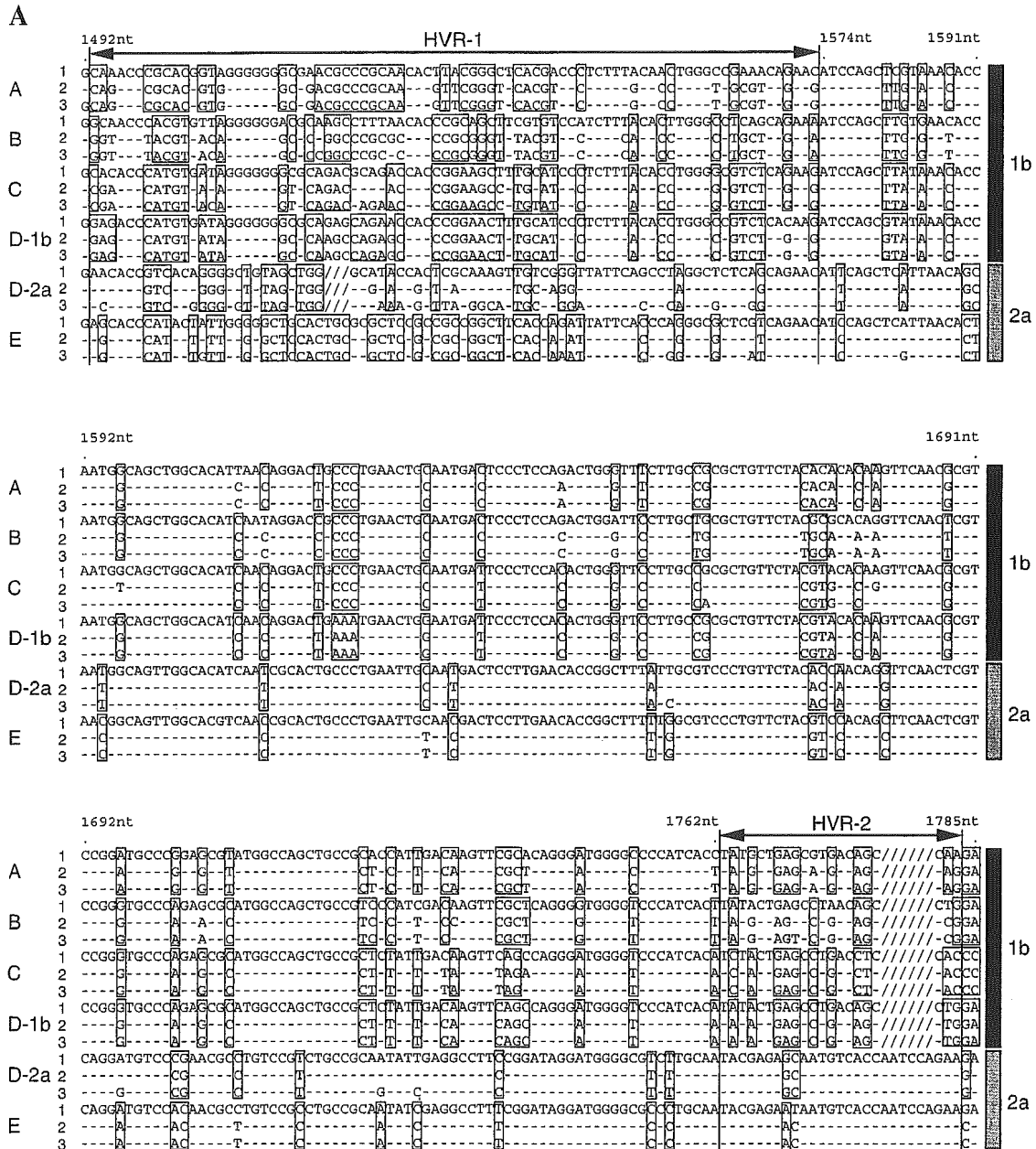


Fig. 2 (continued)

In genotype 2a isolates from patient D (D-2a; Fig. 3), one a.a. deletion was identified in HVR-1 (residue 398, presented as a slash in Fig. 3). In genotype 2a isolates (patients D and E), two additional a.a.s in HVR-2 were noted, as reported elsewhere [21]. The deduced amino acid sequence of the E1 region (corresponding to a.a. 192 ~ 380) in genotype 1b isolates from patient D (D-1b; Fig. 3) could not be amplified by PCR at any time point (points 1–3; Figs. 1, 3).

Amino acid substitution speed in E1/E2 protein region and phylogenetic analysis of HVR-1 during progression of hepatitis C

To elucidate status of the HCV genome during infection, a.a. substitution speed between each point (point 1 to 2 and point 2 to 3; Fig. 1) was calculated as

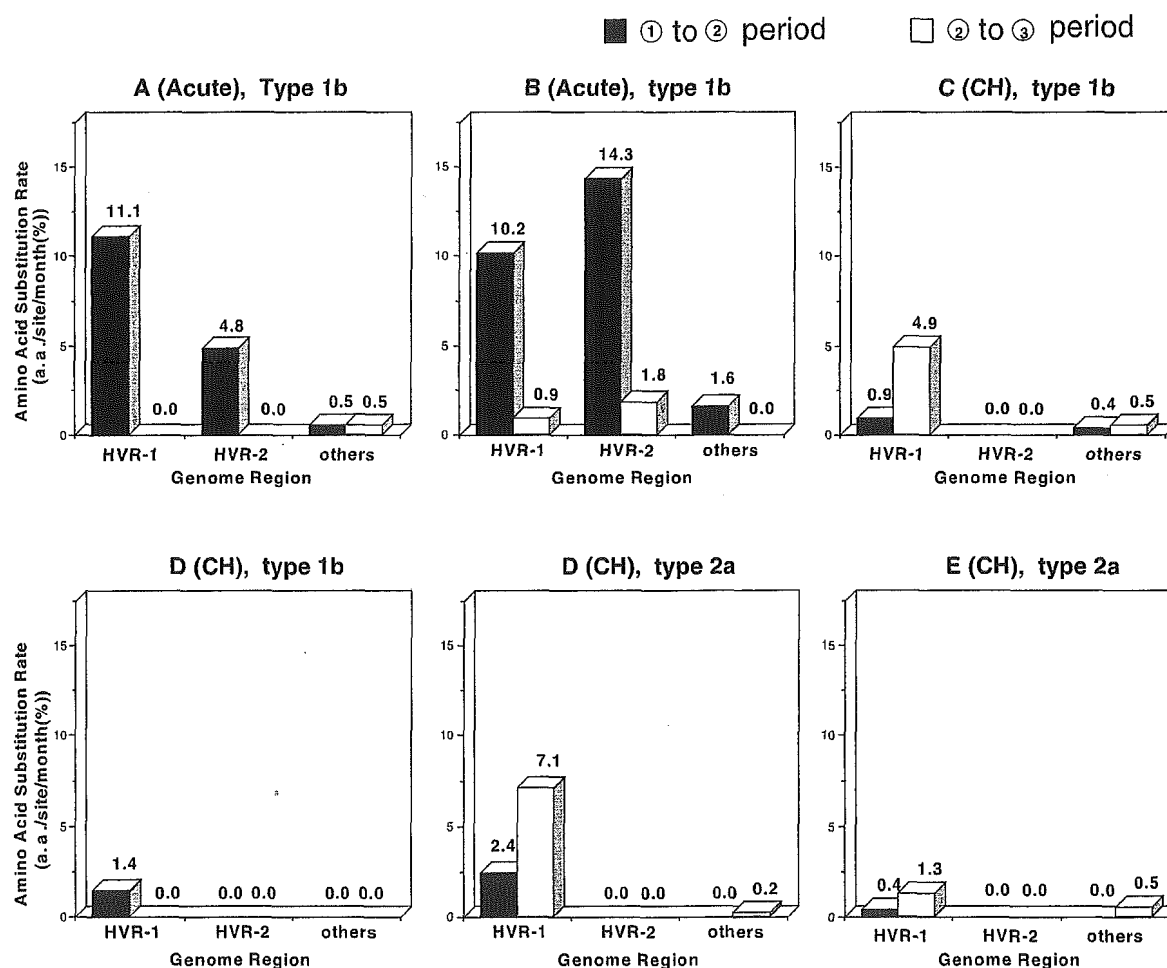


Fig. 4. Amino acid substitution speed in E1/E2 protein within HVR-1, HVR-2 and other regions. Amino acid substitution speed from DNA sequencing points 1 to 2 is indicated by black bars, and speed from points 2 to 3 is indicated by white bars. Regions HVR-1, HVR-2 and others represent a.a. 384–410, 474–480, and 411–473, respectively. *Acute*: acute HCV infection; *CH*: chronic HCV infection

the monthly rate of a.a. substitutions within each region (%; Fig. 4). In the first phase of acute infection (point 1 to 2), a.a. substitution speed in HVR-1 and HVR-2 was significantly faster than in the any other region of E1 and E2 in patients A and B (11.1% and 10.2% for HVR-1; 4.8% and 14.3% for HVR-2, respectively). In the second phase (point 2 to 3) of acute infection, a.a. substitution speed in HVR-1 and HVR-2 was slower than the first phase of acute infection in patients A and B (0% and 0.9% for HVR-1; 0% and 1.8% for HVR-2; 0.5% and 0% for other regions, respectively). In contrast, a.a. substitution speed in chronic patients was 0% in HVR-2 and below 0.5% in other regions (patients C–E; Fig. 4). Amino acid substitution speed in HVR-1 was fast during chronic HCV infection of ALT or when virus RNA levels underwent substantial transitions (patients C–E; Figs. 1, 4). In phylogenetic tree analysis of HVR-1, sequence diversity of HVR-1 in the first phase of acute infection was phylogenetically distant from the original sequence (patients A and B), and the phylogenetic tree of HVR-1 displayed clusters for each of the five patients (data not shown).

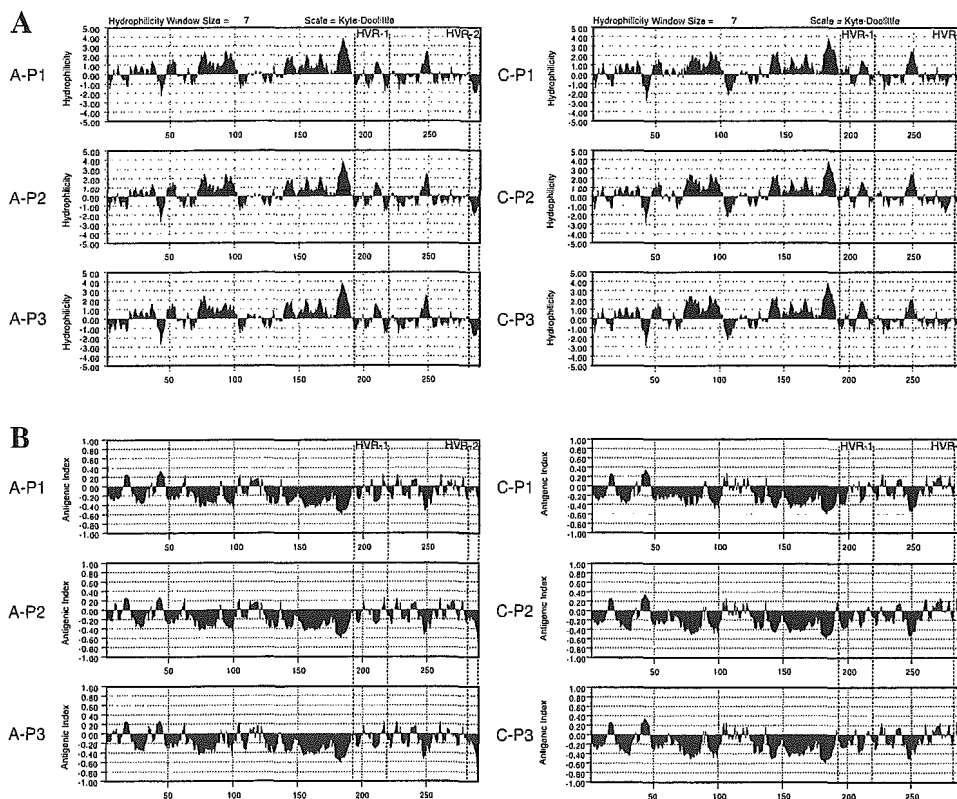


Fig. 5. Structural analysis of E1/E2 protein during HCV infection. Hydrophilicity profiles and antigenic indices of E1/E2 protein as predicted from direct DNA sequencing data were compared between points 1–3 for patients A and C. **A** Hydrophilicity profile. **B** Antigenic index. The presented region for HCV E1/E2 corresponds to a.a. 192–480

*Comparison of protein characteristics for HVR-1 and -2
in the E1/E2 region*

To examine the possibility that structural variation was generated in the E1/E2 region (a.a. 192~480) during disease progression in all five patients (Table 1), hydrophilicity, surface probability and antigenic indices were calculated from deduced a.a. sequences at each point. Figure 5 indicates the results of hydrophilicity (Fig. 5A) and antigenic index analyses (Fig. 5B) in patients A (acute infection) and C (chronic infection). These structural profiles displayed no significant changes during disease progression in patients A and C. The results of surface probability analysis in patients A and C likewise remained basically unchanged during disease progression. These three structural profiles demonstrate no significant changes in E1/E2 protein during the progression of HCV infection. Likewise, the remaining 3 patients (1 acute infection, 2 chronic infections; Table 1) displayed no significant changes in E1/E2 protein during disease progression. Moreover, the predicted secondary structure (chou-Fas) did not show any drastic changes between time points in any of the five patients (data not shown). Although some a.a. substitutions were observed in the E1/E2 region during disease progression in each patient, the major a.a. structure seems likely to have remained conserved in each case.

Humoral immune responses to each synthetic peptide from HVR-1

Synthetic HVR-1 peptides from chronic patients C and E were tested to characterize host immune responses during progression points using ELISA (points 1, 2, and 3; Fig. 1, Table 3). Patient C did not display antibody-positives against their own 3 HVR-1 peptides (C-1, C-2, C-3; Table 3) at any time point. In contrast, patient E displayed antibody-positives against their own 3 HVR-1 peptides (E-1, E-2, E-3; Table 3) at every time point (Table 3).

Discussion

The present study characterized nucleotide sequences of the E1/E2 protein region during clinical course from sera of 2 patients with acute HCV infection and 3 patients with chronic HCV infection using direct DNA sequencing methods. Furthermore, amino acid sequences and protein structures of the E1/E2 protein region (a.a. 192~480) were deduced during disease progression.

Nucleotide sequence variation in the E1/E2 region was mainly observed in HVR-1 and -2 for the 2 acute phase patients, and in only HVR-1 for the 3 chronic phase patients during clinical course. In the E1 protein region, a.a. substitution speed was below 0.69% in all five patients (2 acute patients, 3 chronic patients). This result indicates the possibility that E1 and HVR-2 may not be involved in escape mutation for chronic infection.

Previous reports have suggested that HVR-1 could serve as a target for neutralization of antibody and generation of escape mutants from humoral immune

responses, potentially contributing to the establishment of persistent HCV infection [14, 16, 20]. In our experiment, host immune responses to HVR-1 peptide during the course of chronic infection differed substantially between 2 patients (Table 3). For patient C, no antibody responses against 3 HVR-1 peptides (C-1, C-2 and C-3; Table 3) were observed at any time point. These data suggest two possible explanations. One is that antibodies were not produced in these stages, while the other is that the positions of C-1, C-2 and C-3 peptides might not be included in linear epitopes, instead being included in conformational epitopes. Patient E displayed a consensus sequence in each HVR-1 peptide (peptide sequence, TARSAAGFT; Table 3). For this reason, sera from patient E might react positively for E-1, E-2 and E-3 peptides at each time point. These results indicate the possibility that HVR-1 might not represent a significant epitope region for neutralization of HCV escape mutants in some cases.

Our results indicate the existence of patient-specific conserved nucleotide sequences in the E1/E2 region during clinical course of all HCV patients (Fig. 2). This finding may be useful for identifying HCV vertical transmission and other infection pathways. Furthermore, the existence of these patient-specific nucleotide sequences indicate the possible adaptation of the virus in patients and escape from the host immune surveillance systems in the early phase of HCV infection.

Rate of amino acid substitution speed between each point (point 1 to 2 and point 2 to 3; Fig. 1) during clinical course was calculated as the monthly rate of a.a. substitutions per site (%; Fig. 4). The data indicate that high a.a. substitution speed in HVR-1 and -2 was present in the first phase of acute infection, and that a.a. substitution speed in HVR-1 was elevated in chronic patients during major transitions in viral RNA or ALT levels. This phenomenon should support the understanding of HCV adaptation to host immune pressures and the establishment of persistent HCV infection.

The acute and secondary structures of the E1/E2 protein region (a.a. 192 ~ 380) from patients with hepatitis C displayed no significant change during clinical course. This observation suggests that HCV clones in hepatitis C patients may conserve a E1/E2 protein structure during persistent infection.

In conclusion, our observations suggest that the rapid substitution of amino acid sequences in the first phase of acute phase of infection may be involved the HCV adaptation to host immune pressures and the development of persistent HCV infection.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Dr. Satoshi Tanaka for his thoughtful comments and suggestions. This study was supported by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan and a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

1. Abrignani S (1997) Immune responses throughout hepatitis C virus (HCV) infection: HCV from the immune system point of view. *Springer Semin Immunopathol* 19: 47–55
2. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang Q-X (1999) Hepatitis C virus and other *Flaviviridae* viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 12766–12771
3. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE, Meeks E, Beach MJ (1992) The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 327: 1899–1905
4. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159
5. Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuri S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Nicholas MV (2002) Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 195: 35–41
6. Farci PA, Shimoda A, Wong D, Cabezon D, De Gioannis D, Strazzer A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH (1996) Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzee by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15394–15399
7. Farci P, Bukh J, Purcell RH (1997) The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Semin Immunopathol* 19: 5–26
8. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ (2000) The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288: 339–344
9. Higashi Y, Kakumu S, Yoshioka K, Wakita T, Mizokami M, Ohba K, Itoh Y, Ishikawa T, Takegami M, Nagai Y (1993) Dynamics of genome change in the E2/NS1 region of hepatitis C virus *in vivo*. *Virology* 197: 659–668
10. Itakura J, Nagayama K, Enomoto N, Sakamoto N, Tazawa J, Izumi N, Marumo F, Sato C (2001) CD81 nucleotide mutation in hepatocellular carcinoma and lack of CD81 polymorphism in patients at stages of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 63: 22–28
11. Garcia JE, Puentes A, Suarez J, Lopez R, Vera R, Rodriguez LE, Ocampo M, Curtidor H, Guzman F, Urquiza M, Patarroyo ME (2002) Hepatitis C virus (HCV) E1 and E2 proteins that specifically bind to HepG2 cells. *J Hepatol* 36: 254–262
12. Kao JH, Chen P-J, Lai M-J, Wang TH, Chen DS (1995) Quasispecies of hepatitis C virus and genetic drift of the hypervariable region in chronic type C hepatitis. *J Infect Dis* 172: 261–264
13. Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, Ohkoshi S, Shimotohno K (1993) Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 67: 3923–3930
14. Kato N, Ootsuyama Y, Sekiya H, Ohkoshi S, Nakazawa T, Hijikata M, Shimotohno K (1994) Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* 68: 4776–4784
15. Lanford RE, Chavez D, Chsari FV, Sureau C (1995) Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *J Virol* 69: 8079–8083

16. Lawa Z, Petrick J, Wong V-S, Alexander GJM, Allain JP (1997) Hepatitis C virus genomic variability in untreated and immunocompromised patients. *Virology* 228: 107–111
17. Levy S, Todd S, Maecker H (1998) CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 16: 89–109
18. Monazahian M, Bohme I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S, Thomssen R (1999) Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 57: 223–229
19. Nakatsuji Y, Matsumoto A, Tanaka E, Ogata H, Kiyosawa K (1992) Detection of chronic hepatitis C virus infection by four diagnostic systems: first-generation and second-generation enzyme-linked immunosorbent assay, second-generation recombinant immunoblot assay and nested polymerase chain reaction analysis. *Hepatology* 16: 300–305
20. Odeberg J, Yun Z, Sonnerborg K, Bijoro K, Uhlen M, Lundberg J (1997) Variation of hepatitis C hypervariable region 1 in immunocompromised patients. *J Infect Dis* 175: 938–943
21. Okada S, Akahane Y, Suzuki H, Okamoto H, Mishiro S (1992) The degree of variability in the amino acid terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 16: 619–624
22. Okamoto H, Kojima M, Okada S, Yoshizawa H, Iizuka H, Tanaka T, Munchmre E, Peterson DA, Ito Y, Mishiro S (1992) Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 190: 894–899
23. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, AJ W, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938–941
24. Rice CM (1996) *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), *Fields virology*. Lippincott Raven Publ, Philadelphia, PA, pp 931–959
25. Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta Y, Choo Q, Houghton M, Kuo G (1990) Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6547–6549
26. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425
27. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–5467
28. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblat J, Rivhman KH, Tung J, Crawford K, Bonino F, Saracco G, Choo Q-L, Houghton M, Han JH (1991) Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the Flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180: 842–848
29. Yamaguchi K, Tanaka E, Higashi K, Kiyosawa K, Matsumoto A, Furuta S, Hasegawa A, Tanaka S, Kohara M (1994) Adaptation of hepatitis C virus for persistent infection in patients with acute hepatitis. *Gastroenterology* 106: 1344–1348
30. Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima T (1992) Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon α therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16: 293–299

Author's address: Michinori Kohara Ph.D., Department of Microbiology and Cell Biology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan; e-mail: mkohara@rinshoken.or.jp

特集・C型肝炎の最新治療—治療方針のたて方と治療効果—

治療方針とその効果

高ウイルス量の患者への治療方針と効果

松本晶博*・田中榮司*¹⁾・清澤研道*²⁾

Summary

C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療が始まって15年以上が経過している。従来難治とされてきた1b型高ウイルス量の患者についても、ペグインターフェロンとリバビリンの併用48週間投与法の登場により約50%の著効率が得られるようになった。しかしながら、残りの50%の非著効例や、高齢者や血小板の低い症例など副作用の強いインターフェロン治療が難しい症例に対する治療法の工夫が望まれる。今後シクロスポリンA併用療法、新たな抗ウイルス剤の開発により治療効果がさらに改善されることを期待する。

Key Words

C型肝炎ウイルス (HCV) / 1b型高ウイルス量 / ペグインターフェロン / リバビルン

はじめに

C型慢性肝炎患者に対するインターフェロン療法が始まって15年以上が経った。その間、治療効果に関係する因子について多くのことが解明され、初期の治療に比べ、投与方法の改良、新しいインターフェロンの開発により、治療効果は格段に高まってきた。さらに経口の抗ウイルス剤であるリバビリンの併用により、従来難治であったC型肝炎ウイルス(HCV) 1b型高ウイルス量の患者についてもめざましく治療効果が改善されてきている。

HCV ウイルス量とウイルス型

HCVの定量系には現在PCR法(ポリメラーゼ連鎖増幅法)を用いたアンプリコアモニター法、分岐鎖DNAプローブ法および、HCVコア抗原測定法がある。3者の相関は良く、ウイルス量からみたインターフェロン治療効果予測能はほぼ同等である。高ウイルス量の定義は、アンプリコアモニター法で100 KIU/mL以上、分岐鎖DNAプローブ法で1.0 Meq/mL以上、コア抗原測定法で300 fmol/mL以上である。

現在わが国には主に3つの遺伝子型(1b, 2a, 2b型)のC型肝炎ウイルスが分布して

*信州大学医学部消化器内科(まつもと あきひろ), (たなか えいじ), (きよさわ けんどう) 1) 助教授, 2) 教授

いる。インターフェロンの治療効果はウイルス型によっても大きく異なり、同じウイルス量でも1b型に比べ2a, 2b型では著効率が低い¹⁾。この3つの遺伝子型の中で1b型が約70%を占めており、インターフェロン抵抗性の1b型高ウイルス量患者の割合が約50%と最も多い。

インターフェロンの治療法とその効果

インターフェロンの治療効果は投与方法で異なっている。現在まで臨床の場で主に用いられてきた治療方法は以下の7通りである。

- ①インターフェロン単独24週投与方法、②コンセンサスインターフェロン単独24週投与方法、③ペグインターフェロン単独48週投与方法、④インターフェロン+リバビリン併用24週投与方法、⑤インターフェロン+リバビリン48週投与方法、⑥ペグインターフェロン+リバビリン併用48週投与方法、⑦インターフェロンまたはペグインターフェロン単独長期（2年以上）投与方法である。①から⑥はこの順番にしたが

って治療効果が上昇している。一般に、インターフェロン投与期間が長いほど、また、リバビリンを併用するほど効果が高くなる。特に1b型高ウイルス量患者についてはこの差が著明である。1b型高ウイルス量の症例に対する著効率は、インターフェロン単独24週間投与方法で約5%程度、コンセンサスインターフェロン単独24週投与方法で約10%、ペグインターフェロン単独48週投与方法で約20%、インターフェロン+リバビリン併用24週投与方法で約20%、インターフェロン+リバビリン併用48週投与方法で約45%、ペグインターフェロン+リバビリン併用48週投与方法で約50%である（図1）²⁾。

インターフェロン治療の問題点

インターフェロン治療の最大の問題点はその副作用の強さにある。副作用はペグインターフェロンに比べて従来のインターフェロンで強く、リバビリンを併用するとインターフェロンの副作用の増強効果が見られる。また、

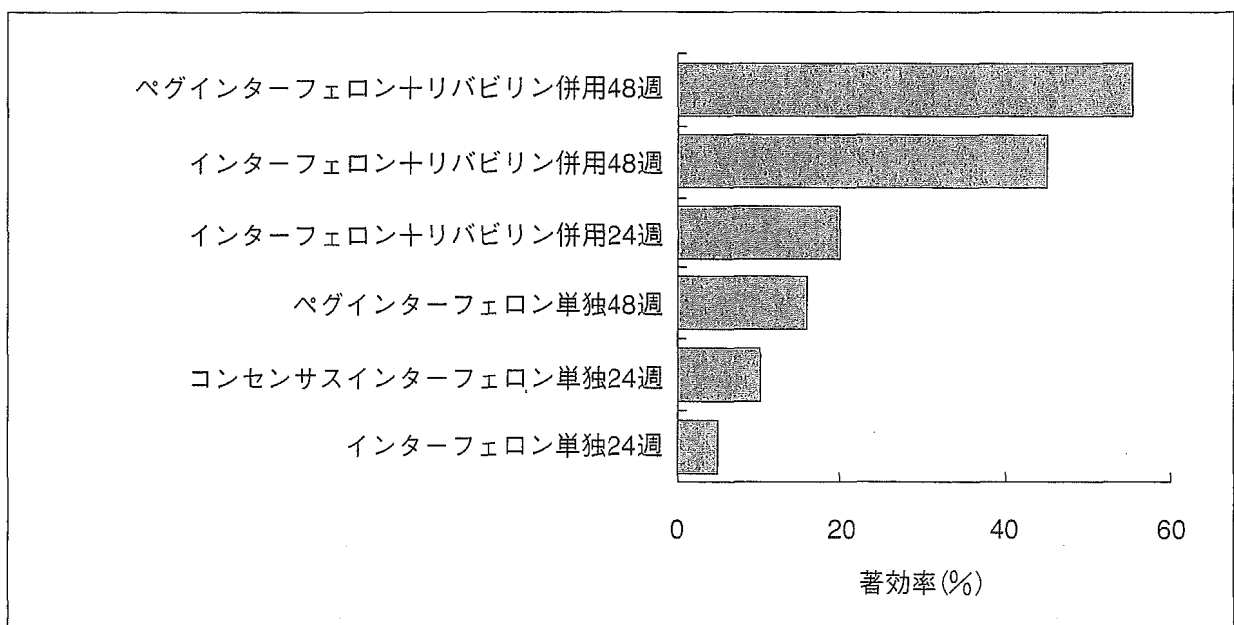


図1 インターフェロン投与方法と HCV 1b 高ウイルス量患者に対する効果

リバビリンはその代謝特徴により血中濃度依存性に溶血がおき、ヘモグロビン量の少ない患者では溶血性貧血が現れる。また、腎排泄のため腎機能の低下した高齢者では副作用が強く現れることがあり注意が必要である。ペグインターフェロンでは発熱や食欲不振などの副作用は従来のインターフェロンに比べて少ないが、血小板減少が強く現れる例も報告されている。

インターフェロンおよびリバビリンは高価であり、患者の経済的な負担も強く費用対効果も念頭に置いて治療する必要がある。

これらの副作用や治療費について患者に十分なインフォームド・コンセントを行い、代替治療についても説明し、治療に対しての理解を得てから治療を開始することが重要である。

ペグインターフェロン＋ リバビリン併用療法

HCV 1b 型高ウイルス量患者に対する治療はやはり治療効果が高いペグインターフェロン＋リバビリン併用48週間投与方法が第1選択となる。現在行われている方法はペグインターフェロン α -2b を週1回1.5 μ g/kg 皮下投与を行い、同時にリバビリンを1日12mg/kg 経口投与する。この治療法により約50%から60%の症例で著効が得られる。著効に関連する因子は現在のところまだ解明されていないが、従来著効率に関連のあったウイルス量や非構造領域 5A の変異はその関連性が薄れている。しかしながらウイルス量がアンプリコアモニター法のハイレンジ法で5,000 KIU/mL を超えるような症例ではやはり著効率が低下する。また、高齢者では治療中止率が高く、著効率が低下する。インターフェロンやリバビリンを投与予定量の80%程度ま

で減量しても効果はそれほど変わらないが、中止すると著効率が低下するため、副作用が出た場合早めに減量して治療を継続することが重要である²⁾。

血小板減少例に対する治療

ペグインターフェロンを使用する場合に注意すべき点は、作用持続期間が長いことため副作用が現れた場合にすぐ血中濃度を下げるのが難しいことである。特に血小板減少には注意が必要である。C型肝炎の場合、肝線維化が進んでいる症例では脾機能亢進により血小板が減少している。ペグインターフェロンを安全に使用できる血小板値は開始時に10万/ μ L以上とされている。血小板の値がこれ以下で治療を開始した場合はすぐに減量したり中止したりしなければならず、十分な治療ができないことが多い。治療開始時の血小板が低い症例では、脾動脈塞栓術や脾臓摘出術を行って血小板値を上げてからインターフェロン療法を行う例もある³⁾。血小板値がコントロールしにくい場合は、インターフェロンの体内濃度を調整しやすい従来のインターフェロン＋リバビリン併用48週間投与も考慮するべきであろう。

非著効例、副作用が強い例、 高齢者に対する治療

ペグインターフェロンまたはインターフェロン＋リバビリン併用48週療法非著効例や副作用による治療継続困難例に対してはウイルス消失効果を得ることが難しいため、発癌抑制を狙ってインターフェロン少量長期投与を考慮する。特に肝線維化進行例で、ウルソデオキシコール酸やグリチルリチン製剤によるトランスアミナーゼ抑制効果が低い場合に導

入ることが望ましい。インターフェロン療法
の年齢的な限界は70歳程度と考えられて
おり、それ以上の高齢者の場合は患者個々の
状態により判断すべきであろう。高齢者や肝線
維化の軽い例では、ウルソデオキシコール酸
やグリチルリチン製剤の投与を行いトランス
アミナーゼを抑制する。また、瀉血および鉄
制限食による除鉄療法も有効である。

今後の展開

近年、免疫抑制剤であるシクロスポリン
Aの抗ウイルス効果が注目されている⁴⁾。C
型肝炎関連の肝移植例では術後高率に肝炎が
再燃し、ウイルス量が高値となり、肝線維化
の進行が早いため、移植後のインターフェロ
ン療法が必要であると考えられている⁵⁾。肝
移植後に免疫抑制剤としてシクロスポリン
Aが用いられることがあるため、インター
フェロンとリバビリンとの3者併用療法を行
うことが検討されている。また、シクロスポ
リンAの類似体で免疫抑制効果が無く、抗
ウイルス効果のみを持った薬剤の臨床応用が
検討されている⁶⁾。

おわりに

新しいインターフェロン製剤の導入により
1b型高ウイルス量の難治性C型肝炎に対す
る治療効果は著しく向上してきている。今後
開発される薬剤の導入によりさらなる治療効

果が期待される。しかしながらこれらの治療
抵抗性のウイルスもおり、今後ウイルス側の
みでなく宿主側の条件も解析し、より効果的
な治療法の開発が望まれる。

文 献

- 1) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki T *et al* :
Viral and host factors that contribute to effi-
cacy of interferon-alpha 2a therapy in patien-
ts with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* **39** :
1273-1280 (1994)
- 2) 飯野四郎, 沖田 極, 小俣政男ほか : Geno-
type 1かつ高ウイルス量のC型肝炎に対する
PEG-インターフェロン α -2bとリバビリン
48週併用療法の有効性. *肝胆膵* **49** : 1099-
1121 (2004)
- 3) Moreno A, Barcena R, Blazquez J *et al* :
Partial splenic embolization for the treatment
of hypersplenism in cirrhotic HIV/HCV
patients prior to pegylated interferon and
ribavirin. *Antivir Ther* **9** : 1027-1030 (2004)
- 4) Nakagawa M, Sakamoto N, Enomoto N *et al* :
Specific inhibition of hepatitis C virus
replication by cyclosporin A. *Biochem Bio-
phys Res Commun* **313** : 42-47 (2004)
- 5) 菅原寧彦, 幕内雅敏 : C型肝炎硬変に対する肝移
植の現況と展望. *日本臨床* **62**(増刊号7) : 605
-609 (2004)
- 6) Mlynar E, Bevec D, Billich A *et al* : The non-
immunosuppressive cyclosporin A analogue
SDZ NIM 811 inhibits cyclophilin A incorpora-
tion into virions and virus replication in
human immunodeficiency virus type 1-infect-
ed primary and growth-arrested T cells. *J Gen
Virol* **78** : 825-835 (1997)

特集II C型肝炎の自然経過と治療介入

C型肝炎の自然経過*

梅村 武司**
清澤 研道****Key Words** : fibrosis, interferon therapy, hepatocellular carcinoma(HCC), hepatitis C virus (HCV)

はじめに

本邦ではC型肝炎ウイルス(HCV)感染者は約150~200万人いると推定され、国民の健康を脅かす社会問題となっている。C型慢性肝炎は、肝線維化が緩徐に進行し肝硬変、肝癌に至る。わが国では、毎年3万人を超える人が肝癌で亡くなっており、近年急激にその数が増加している。肝癌患者の8割以上はHCV感染者が占めている。C型慢性肝炎の根本的治療としてインターフェロンが用いられており、近年ではリバビリンとの併用、さらにペグインターフェロンの導入によって、ウイルス駆除率は劇的な改善を認めている。その治療効果、ことにウイルス駆除効果と長期的治療効果が明らかにされてきており、本稿ではC型肝炎の自然史について概説する。

自然史を明らかにすることは難しい

通常、病気の自然史を明らかにするためにはいくつかの事柄が正確に把握されなければならない。これらは感染、病気の発症時期がはっきりとし、治療によって修飾されず、前向きコホー

トで観察されている、罹病率、死亡率は判明していることなどである。しかし、アルコールの多飲、HBVやHIVの重複感染など他の因子の影響が関与する場合や抗ウイルス療法が行われている状況では、C型肝炎の自然史を正確に観察することは非常に困難である。輸血などの感染時期が明らかな症例を除けば感染時期も特定することは難しい状況であり、C型肝炎の自然史は完全に理解されてはいない。

C型肝炎の自然史

急性C型肝炎を発症した患者のうち倦怠感や黄疸などの症状を呈するものは少なく、大多数のHCV感染者は無症状であり気づかずにいる。急性C型肝炎のうち54~86%の症例で慢性化することが報告されている(図1)^{1)~9)}。急性肝炎から慢性肝炎、さらに肝硬変へと進展する場合も症状が出現しないことが多い。症状が出現したときは非代償性肝硬変になり、時には肝癌の合併を認めている時である。しかし、ここまでに何十年という経過を経ているのが実際のところである。よって、C型肝炎の自然史を確定するのは非常に難しいため、さまざまな研究デザインを用いて明らかにする努力がなされている。ここでは代表的な後ろ向きコホート(retrospective study)、前向きコホート(prospective study)、これらを合わせた後ろ向き-前向きコホート

* Natural history of hepatitis C.

** Takeji UMEMURA, M.D., Ph.D. & Kendo KIYOSAWA, M.D., Ph.D.: 信州大学医学部消化器内科(〒390-8621 松本市旭3-1-1); Department of Medicine, Gastroenterology and Hepatology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto 390-8621, JAPAN

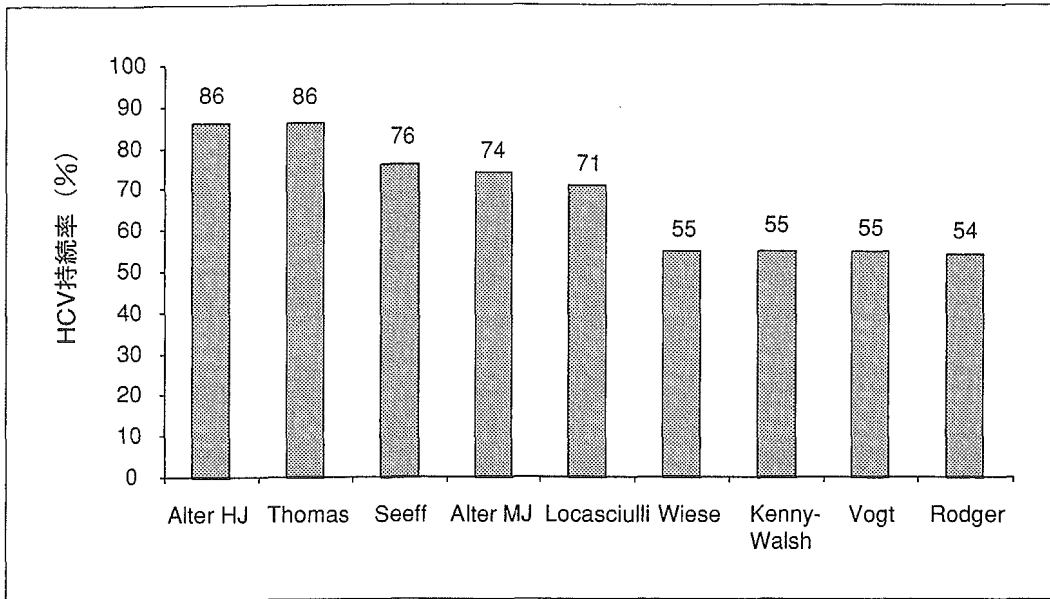


図1 急性C型肝炎後のHCV感染の持続率(文献¹⁰⁾より引用改変)

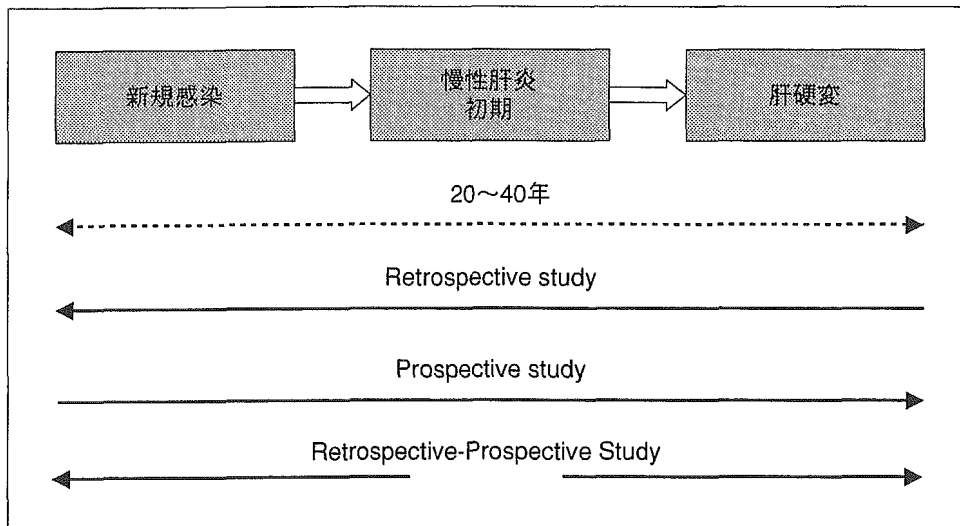


図2 C型肝炎の自然史を明らかにするための研究デザイン(文献¹⁰⁾より引用改変)

(retrospective-prospective study)での研究について解説する(図2)¹⁰⁾。

1. 後ろ向きコホート

1990年にKiyosawaらが231名の非A非B型慢性肝疾患においてHCV抗体を測定することによってC型肝炎の長期経過を明らかにした¹¹⁾。さらに輸血歴のあるC型肝炎症例の経過から感染から慢性肝炎、肝硬変、肝癌へ至るまでの平均年数をそれぞれ、10年、21年、29年であることを初めて示した。同様のデータがアメリカのTongらのグループからも報告された¹²⁾。

C型肝炎の20年、30年にわたる長期の経過の後には、肝硬変、肝癌へと進展することが明らか

かになった(図3)。ただし、この数字についてはあくまでも平均であり、輸血年齢(感染時期)が若年と高齢では病状進展度が相違することがわかっている¹³⁾¹⁴⁾。

2. 前向きコホート

欧米では輸血後急性非A非B肝炎患者についての経過観察を行うことでその大部分を占める急性C型肝炎患者の自然史が明らかになっている。これらの結果から肝硬変、肝癌の発生はそれぞれ7~16%(平均11%)、0.7~1.3%であり、後ろ向きコホートと比較すると低いことが判明している^{15)~18)}。

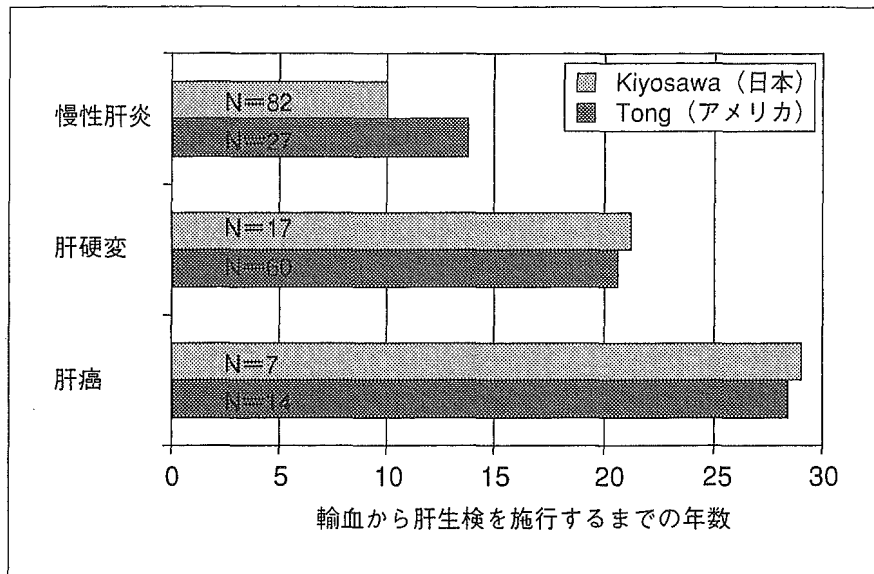


図3 輸血によるHCV感染から慢性肝疾患発症までの期間

表1 C型肝炎の後ろ向き-前向きコホートの研究

研究	集団	期間(年数)	肝硬変(%)	肝癌(%)	肝臓死(%)
Vogt	子供	17	0.3	0	0
Kenny-Walsh	若い女性	17	2.0	0	0
Wiese	若い女性	20	0.4	0	0
Seeff	若い男性	45~50	5.9	0	0
Thomas	薬物濫用者	9~15	1.0	0	2.1
Rodger	Community	25	4.0	0	1.0
Seeff	輸血後肝炎	23	15.0	1.9	2.8

(文献¹⁰⁾より引用改変)

3. 後ろ向き-前向きコホート

過去に急性C型肝炎を発症した患者群を集め、その群を前向きに経過観察しなおしたものである。代表的な7つの研究を表1に示す。それぞれの背景を簡単に説明するとVogtら⁶⁾は3歳までに心臓手術を施行された458名の子供達について、Kenny-Walshら⁷⁾、Wieseら⁸⁾はHCVに感染した免疫グロブリンを使用された若い女性についてそれぞれ62,667名、2,867名について検討している。Thomasら²⁾は1,667名の薬物濫用者、Rodgerら⁹⁾もほとんどが薬物濫用者である95名について、Seeffら¹⁰⁾は連鎖球菌の抗体を測定した約9,000例の兵士についてHCVを測定している。これらの結果からは肝硬変、肝癌への進展はそれぞれ0.3~5.9%(平均2.1%)、0%といずれの群の中でもっとも低率であった。

肝硬変の出現する頻度は後ろ向きでは42%、前向きでは11%、後ろ向き-前向きでは2.1%で

あった。後ろ向きコホートの研究はすでに症状が出現し、病状が進行している患者たちが集中しやすく、急性肝炎が自然に治癒した例や、比較的軽度な肝障害の患者は集まりにくい。前向きコホートは輸血後に発症したC型肝炎を観察しているが、経過観察期間が8~16年と短いため、まだ結論を導き出すには至らない。しかし、後ろ向き-前向きコホートではさまざまな性、年齢の人々を対象としており、ほとんどの例で急性発症の時期が判明しており経過観察の期間も前向きコホートより長期である。

最近ではオーストラリアのグループがC型肝炎の自然史について過去に発表された論文を解析し、報告している²⁰⁾。著者らは過去に報告のあった145編の論文のうち20例未満の報告、年齢もしくは感染期間が明言されていない論文を除いた57編について解析している。著者らはこれらの論文を4つの群