

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

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

分担研究者 恩地森一 愛媛大学医学部第三内科 教授

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

共同研究者

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

C. 研究成果

HCV を発現させた後、RNA および蛋白を 9 日間抽出

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

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

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

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

D. 考察

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

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

E. 結論

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

参考文献

1. Contreras AM, Hiasa Y, He W, Terella A, Schmidt EV, Chung RT; Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol* 76; 8505-8517, 2002.
2. Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* (in printing).
3. Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. *J Virol* 75; 6209-6211, 2001.
4. Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in sera and peripheral blood mononuclear cells of HCV mono-infected and HIV/HCV co-infected persons. *J infect Dis* (in printing).

F. 健康保険情報 特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT,

Schmidt EV, Chung RT. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* (in printing).

- 2) Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Jamieson DJ, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in sera and peripheral blood mononuclear cells of HCV mono-infected and HIV/HCV co-infected persons. *J infect Dis* (in printing).

2. 学会発表

- 1) 日浅陽一、堀池典生、Chung, Raymond T.、道堯浩二郎、熊木天児、黒瀬清隆、恩地森一. C型肝細胞癌組織中の Protein kinase R (PKR)の発現量の増加とその機能変化の有無. 第40回日本肝臓学会総会(2004.6.3-4 千葉県浦安市)
- 2) Hiasa Y, Blackard JT, Tokumoto Y, Horiike N, Michitaka K, Kamegaya Y, Schmidt EV, Chung RT, Onji M. Interferon and ribavirin each stimulate hepatocyte interleukin-8 gene expression in a cell-based HCV replication model. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2003.10.29-11.2 Boston, MA, USA)
- 3) Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, Horiike N, Onji M, Rodriguez I, Mayer KH, Chung RT. Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral blood compartments of HIV-/HCV+ and HIV+/HCV+ women. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2003.10.29-11.2 Boston, MA, USA)
- 4) Lin W, Choe WH, Hiasa Y, Kamegaya Y, Blackard JT, Clair JBS, Schmidt EV, Chung RT. HCV subverts interferon signaling by inducing selective degradation of STAT1. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2003.10.29-11.2 Boston, MA, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働省科学研究費肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

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

分担研究者 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

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

共同研究者：林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科・教授

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

ウイルスの排除 (EVR) をもとにウイルス排除および非排除を判定した。

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究成果

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

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

D. 考察と結論

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

E. 研究発表

論文発表

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

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

学会発表

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

厚生科学研究費補助金 肝炎当克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型慢性肝炎に対するインターフェロン+リバビリン療法

分担研究者 茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科

研究要旨：C型慢性肝炎に対するインターフェロン $\alpha 2b$ +リバビリン療法の至適インターフェロン投与量を決定するため、インターフェロン $\alpha 2b$ の 6MU と 10MU の 2 群における無作為比較試験を行った。両群における治癒率はほぼ同等であり、血球減少等によるインターフェロンの減量は 10MU 群で多い傾向が見られた。従って、経費、効果、副作用の点から指摘投与量は 6MU であると考えられた。

共同研究者

高橋祥一 広島大学医歯薬学総合研究科

A. 研究目的

インターフェロンによる C 型慢性肝炎の治療効果はリバビリンを併用することにより飛躍的に向上し、難治例とされる genotype 1b、高ウイルス量の症例でも 20% 程度の治癒が見込めるようになった。現在保険診療でリバビリンとの併用投与が認可されているのはインターフェロン $\alpha 2b$ のみであるが、このインターフェロン $\alpha 2b$ 製剤には 6MU と 10MU の 2 種類の製剤がある。このどちらを用いるのが効果、副作用、経費の面から優れているのかを比較検討し至適要領を決定することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

広島肝臓スタディーグループの施設において、200 例を対象として研究を行った。症例は乱数表を用いて作製された 2 群の振り分け表に従い、封筒法で 6MU か 10MU のいずれかの群に割り当てられた。投与は最初の 2 週間は原則として入院し、インターフェロン $\alpha 2b$ の筋肉注射を行った。その後は通院で 24 週まで投与を行った。白血球減少、血小板減少、貧血などの副作用がみられた際にはインターフェロン、リバビリンを減量あるいは中止とした。治療終了後 6 ヶ月後の HCV RNA 陰性、トランスアミナーゼ正常化を示した症例をウイルス学的著効例と判定した。対象の内訳は 6MU 群が男性 63 例、女性 37 例、11MU 群が男性 75 例、女性 25 例で、平均年齢はそれぞれ 55 歳、54 歳であった。両群の肝生検による組織学的進行度、ALT 値には有意差を認めなかった。Genotype は 6MU 群では 1b が 80 例、それ以外が 20 例、10MU 群では 1b が 72 例、それ以外が 18 例で両群間に差はなく、ウイルス量も同様に有意差を認めなかった。(倫理面への配慮)広島大学医学部倫理委員会において承認された説明文章、同意書により試験の目的、趣旨、方法、治療効果、副作用、個人情報守秘、患者の権利保障などについて十分に説明を行い、患者が熟考するのに十分な時間の後に書面による同意の得られた症例のみを対象として試験を行った。

C. 研究結果

(1) 治療完遂率

減量、休薬なく治療を完遂し得た症例はインターフェロン $\alpha 2b$ 6MU 投与群で 61%、10MU 投与例で 47%

であり 6MU 群が多かった。減量、休薬を行いながらも最後まで治療を遂行し得たのは 6MU 群で 22 例、10MU 群で 28 例であり減量なく投与を完遂し得た症例をあわせると 6MU 群で 83 例、10MU で 75 例であり前者が多かった。インターフェロンあるいはインターフェロンとリバビリン両者の減量は 6MU 群で 4 例、10MU 群で 13 例と後者が多かった。

(2) 治療効果

ウイルス学的著効(治療終了後 6 ヶ月後の HCV RNA 陰性、トランスアミナーゼ正常化) が得られた症例は ITT 解析では 6MU 群で 32%、10MU 群で 28% であり、むしろ 6MU 群が多かった。HCV RNA は持続陰性化しなかったが、トランスアミナーゼが正常化した biochemical responder は 6MU 群で 14%、10MU 群で 10% であった。従って、インターフェロンの投与量が多くても、必ずしも著効率が上昇する訳ではないことが明らかとなった。ウイルス量別の比較では、HCV RNA が 100kIU/ml 以上 500kIU/ml 未満の比較的ウイルス量が少なめの症例では 6MU 群で 52%、10MU 群で 33% であった。HCV RNA が 500kIU/ml 以上 850kIU/ml 未満の中等度のウイルス量の症例では 6MU 群で 14%、10MU 群で 19% で、この群の著効率が最も不良であった。さらに 850kIU/ml 以上の超高ウイルス量群では 6MU 群で 34%、10MU 群で 27% であった。従って、インターフェロン単独に夜治療の際にみられたウイルス量が多いほど治療効果が劣るという成績とは異なる結果となった。さらに、ウイルスの genotype 別に治療効果をみると、genotype 1b では 6MU 群で 21%、10MU 群で 22%、genotype 2a/2b では 6MU 群で 74%、10MU 群で 43% であった。また、最も難治であるとされる genotype 1b、850kIU/ml の症例に限ってみても、6MU 群で 22%、10MU 群で 27% であった。多重ロジスティックモデルによる治療効果に寄与する要因としては genotype (Odds ratio 9.321, $P < 0.0001$) および投与の完遂(odds ratio 0.031, $P < 0.0001$) であり、減量、休薬があっても治療を最後まで完遂することが重要であることが示された。また、投与量の 6MU と 10MU を強制投入しても有意に治療効果に寄与する因子とはならず、6MU で十分であると考えられた。治療脱落例の要因としては、6MU 群では倦怠感 5 例、貧血 5 例、食思不振 2 例、間質性肺炎 1 例、肝細胞癌の発症 1 例、頭痛 1 例、筋肉痛 1 例、網膜症 1 例、不眠 1 例、焦燥感 1 例、自己中止 1 例で重複してみられた症例もあり、最終的には 17 例が治療脱落となった。また、10MU 群では倦怠感 5 例、自己中止 5 例、鬱 4

例、貧血3例、食思不振3例、焦燥感1例、嘔気嘔吐1例、不眠1例、白血球減少1例、皮疹1例、間質性肺炎1例、脱毛1例、心筋梗塞1例、胸部不快感1例、顔面神経麻痺1例であり、重複例をのぞいて25例が脱落となった。

以上の結果から、効果、副作用、経済的な面からインターフェロン α 2bの至適投与量は6MUであると考えられた。

D. 考察

本研究によりインターフェロン α 2b+リバビリン療法の至適インターフェロン投与量は6MUであることが明らかとなった。一般的にはインターフェロンの投与量が多いほど、治癒率も高まると考えられるが、今回の研究では特に10MU投与群で特に治癒率の向上はみられなかった。逆に、インターフェロンの減量に至る症例は10MU投与群で多く、投与量が多いほど副作用も強いことが示唆された。むしろ今後はさらに投与量を減らし、長期投与に備えるべきであると考えられた。今後はPEGインターフェロンとリバビリンの併用が治療の主体となると考えられる。PEGインターフェロンの日本人における至適投与量も今後検討してゆくべきと考えられる。

E. 結論

C型慢性肝炎に対するインターフェロン α 2b+リバビリン療法のインターフェロン α 2bの6MUと10MUの2群における無作為比較試験を行い、両群における治癒率はほぼ同等であり、血球減少等によるインターフェロンの減量は10MU群で多い傾向が認められた。従って、経費、効果、副作用の点から指摘投与量は6MUであると考えられた。

F. 健康危険情報

リバビリン、インターフェロンの副作用の既知のものが認められた。10MUを使用するときには特に血球減少等に注意を払う必要がある。

G. 研究発表

論文発表

1) 石原浩人, 高木慎太郎, 森 奈美, 児玉英明, 丁

守哲, 柘植雅貴, 今村道雄, 河野博孝, 白川寛夫, 相方 浩, 大石和佳, 高石英樹, 高橋祥一, 神安雅哉, 茶山一彰. C型慢性肝炎高ウイルス量患者に対するIFN- δ 2b+ribavirin 併用療法-6MU 導入群と10MU 導入群における Randomized Control Study-第90回 日本消化器病学会総会. 2004年4月22日:仙台.

2) 丁 守哲, 高木慎太郎, 森 奈美, 児玉英明, 柘植雅貴, 今村道雄, 河野博孝, 白川寛夫, 相方 浩, 石原浩人, 大石和佳, 高石英樹, 高橋祥一, 神安雅哉, 茶山一彰. C型慢性肝炎高ウイルス量患者に対するIFN-d2btribavirin 併用療法とコンセンサス 1FN療法における Randomized control study.第90回 日本消化器病学会総会. 2004年4月23日:仙台

3) 丁 守哲, 高木慎太郎, 森 奈美, 児玉英明, 柘植雅貴, 今村道雄, 河野博孝, 白川寛夫, 相方 浩, 石原浩人, 大石和佳, 高石英樹, 高橋祥一, 神安雅哉, 茶山一彰.覚醒剤, 入れ墨既往歴を有する若年者 4) C型慢性肝炎患者の背景とIFN治療成績.第40回 日本肝臓学会総会. 2004年6月4日:浦安.

丁 守哲, 高木慎太郎, 森 奈美, 児玉英明, 柘植雅貴, 今村道雄, 河野博孝, 白川寛夫, 相方 浩, 石原浩人, 大石和佳, 高石英樹, 高橋祥一, 神安雅哉, 茶山一彰.HCV陽性肝細胞癌の局所根治療法後におけるインターフェロン投与の意義.第40回 日本肝臓研究会. 2004年6月25日:筑波

5) 高橋祥一, 高木慎太郎, 森 奈美, 丁 守哲, 児玉英明, 柘植雅貴, 木村その子, 今村道雄, 河野博孝, 白川寛夫, 相方 浩, 石原浩人, 大石和佳, 高石英樹, 神安雅哉, 茶山一彰. C型慢性肝炎に対するインターフェロン, リバビリン併用療法の前処置としてのG1白血球除去カラムの使用経験.第81回 日本消化器病学会中国支部例会. 2004年6月12日:岡山.

6) 丁 守哲, 高木慎太郎, 森 奈美, 児玉英明, 白川寛夫, 相方 浩, 石原浩人, 高橋祥一, 茶山一彰. 1b高ウイルス量症例に対するIFN-Ribavirinの治療効果に寄与する要因.第8回 日本肝臓学会大会. 2004年10月21日:福岡.

H. 知的財産権の出願・登録情報

今回の研究内容については特になし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

Genotype 1b 型かつ高 HCVRNA 量の C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN α 2b・Ribavirin 併用療法による薬物動態と治療効果予測

分担研究者 泉 並木 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

研究要旨: Genotype 1b 型かつ高 HCVRNA 量の C 型慢性肝炎はわが国の C 型肝炎例の 6 割以上を占める。PEG-IFN α 2b と ribavirin 併用による 48 週間の治療が行えるようになったが、そのウイルス排除機序や治療中効果予測の詳細は明らかになっていない。PEG-IFN α 2b・ribavirin 併用で 48 週間の治療を行った症例の、治療効果予測を解析し、薬物動態との関連について検討した。その結果治療前のウイルス学的所見や肝組織所見、臨床検査で治療効果予測ができる因子はなく、治療開始後のウイルス減少率のみが有意の効果予測因子であった。Negative predictive value は治療開始 12 週目の HCVRNA 量の 2 log drop あるいは 16 週の 3 log drop で 100% 予測しえた。この early virological response を達成できた場合、75% がウイルス排除が得られた。治療中の血中インターフェロン濃度や ribavirin 濃度とウイルス学的効果については関連性が認められなかった。

共同研究者

朝比奈靖弘 武蔵野赤十字病院 消化器科 副部長
黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 副部長

(倫理面への配慮)

今回の解析はすべて開発治験で行った。施設内治験審査委員会および倫理委員会での承認を得た。臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報等の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した（新 GCP に遵守）。

A. 研究目的

わが国では genotype 1b 型・高 HCVRNA 量の難治性 C 型慢性肝炎が 6 割以上を占め、従来の interferon 単独治療でウイルス排除が達成できない場合が多く、肝発癌を十分防止することができなかつた。PEG-IFN α と ribavirin 併用治療が行えるようになって約半数にウイルス排除が得られると期待されるが、治療効果を予測する因子や作用機序について詳細な解明はなされていない。今回は genotype 1b 型・高 HCVRNA 量の C 型慢性肝炎症例について PEG-IFN α 2b と ribavirin 併用治療を行った症例について、ウイルス学的著効 (sustained virological response; SVR) に関連する因子を解析し、治療効果予測因子を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

(1) PEG-IFN α 2b+ribavirin 併用 48 週間治療における SVR に関与する因子

当科において PEG-IFN α 2b と ribavirin 併用 48 週間の治療を行った 38 例を対象とした。SVR は 21 例、非 SVR は 17 例である。治療前の性、年齢、体重、血液・生化学検査、HCVRNA 量、肝組織所見について SVR に関連する因子を解析した。

(2) 治療効果予測

PEG-IFN α 2b と ribavirin 併用で治療した genotype 1b かつ高 HCVRNA 量例について、治療開始後の HCVRNA 量の減衰を real-time PCR 法にて測定し、治療中に効果予測がどの程度できるかについて解析した。実際に negative predictive value が 100% になる時点を算出し、さらに positive predictive value を計算した。

(3) 薬物動態

PEG-IFN α 2b と ribavirin 併用療法を行った症例について、血中 IFN 濃度および ribavirin 濃度を詳細に経時的に解析し、治療効果との関連について検討した。

C. 研究結果

(1) PEG-IFN α 2b+Ribavirin 併用 48 週間治療の SVR に関与する因子

併用療法 48 週間の治療で SVR が 21 例、非 SVR は 17 例であった治療開始前の単変量解析では SVR の方が年齢が若く、ヘモグロビン値が高かったが、それ以外の性、血小板、AST、ALT 値、HCVRNA 量、NS5A 領域 (interferon sensitivity determining region; ISDR) アミノ酸変異、肝組織の線維化や活動性などは SVR と非 SVR には差はみられなかった。治療前の HCVRNA 量をハイレンジ法を用いて検討すると、3,000, 4,000 KIU/mL 以上の高ウイルス量例でも 50% を超える SVR 例がみられ、高い治療効果が認められた。しかし、治療前の HCVRNA 量から SVR を予測することは困難と考えられた。

多変量解析では、治療開始後の HCVRNA 量の減衰率のみが有意の SVR 関連因子であり、年齢やヘモグロビン値は有意でなかった。HCVRNA 減衰率は初期 (第 1 相) のみならず、2 日目から 14 日目の第 2 相、14 日目から 72 日目の第 3 相いずれも有意に SVR 例の方が減衰率がよかつた。したがって、治療開始後の HCVRNA 量の推移を観察することが重要であると考えられた。

(2) 治療効果予測

治療開始後の HCVRNA 量の減衰率から SVR 予測を解析した。Negative predictive value が 100% になる時点を解析すると、12 週目の 2 log drop (治療前の 100 分の 1 になる) が抽出された。逆に positive predictive value を解析すると、12 週目の 2 log drop が達成できる率が 80% であり、これを達成できると 75% が SVR となり、さらに 16 週目の 3 log drop 達成

率が80%で、達成できた場合には75%がSVRになった。したがって治療開始後のHCVRNA量のモニターが重要になってくる。

(3) 薬物動態

SVR例と非SVR例について、血中インターフェロン濃度およびribavirin濃度の関連を検討した。インターフェロン濃度はPEG-IFN α 2b投与によって1週間治療域血中濃度が保たれ、48週間の間トラフ値での上昇はみられなかった。SVRと非SVRの間には血中インターフェロン濃度に差は認められなかった。また、ribavirin濃度は4~8週目で最高値に達し、治療中は同じ程度の値を維持していたが、SVRと非SVRの間には差はみられなかった。

D. 考察

(1) PEG-IFN α 2bとribavirin併用による48週間の治療においては、治療前のHCVRNA量が非常に高い場合でもSVRが得られる。しかし、治療前のウイルス量からSVRを予測することが困難であった。そこで治療開始後のウイルス量をモニターし、治療効果予測をたてることが重要と思われた。今回の解析から体重はSVRに関連する因子ではなく、体重毎の投与量の調節の影響と考えられた。

(2) 治療効果(SVR)の予測は治療初期には困難で、治療開始12ないし16週目までHCVRNA量をモニターすることが重要であった。とくに非治癒予測(negative predictive value)は12週の2 log dropあるいは16週の3 log dropではじめて100%となり、非治癒を予測するのはかなり後半期であることが証明された。一方、12週の2 log dropあるいは16週の3 log dropが達成できた場合には75%がSVRとなっており、治療継続の決断に役立つと考えられた。

(3) 薬物動態

SVRと非SVRの間には血中インターフェロン濃度やribavirin濃度に差はなかった。従来インターフェロン単独治療においては早期ウイルス陰性化が重要と考えられていたため、初期高容量連日のインターフェロン投与が推奨されていたが、PEG-IFN α 2bと

ribavirin併用療法においてはインターフェロンの投与量を増加させたり、ribavirin量を増やしてもSVR率の上昇にはつながらない可能性が考えられた。安全性を重視して治療を継続し、48週間の治療を完遂することが治療成績向上のために重要と考えられた。

E. 結論

PEG-IFN α 2bとribavirin併用によって高いウイルス排除率が得られる。投与開始後のHCVRNA量をモニターすることが、治療効果予測に重要である。薬物動態の解析から、インターフェロンやribavirinの血中濃度は治療効果との明らかな関連はみられず、投与量の増加はウイルス排除率の上昇につながらないと考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Izumi N, Asahina Y, et al. A comparison of the exponential decay slope between PEG-IFN alfa-2b/ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C genotype 1b infection and a high viral load. *Intervirology* 2004;47:102-7.

2) Asahina Y, Izumi N, et al. Interferon-stimulated gene expression and hepatitis C viral dynamics during different interferon regimens. *J Hepatol* 2003;39:421-7.

3) Izumi N, Kumada H, et al. Rapid decrease of plasma HCVRNA in early phase of twice daily administration of 3MU doses interferon-beta in patients with genotype 1b hepatitis C infection: a multicenter randomized study. *Dig Dis Sci* 2001;46:516-23.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C 型慢性肝炎の IFN 治療における Ribavirin 濃度と治療効果

分担研究者 清澤研道 信州大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：C 型慢性肝炎に対する Interferon (IFN) α -2b+ Ribavirin 併用療法の治療中止・減量に対する血液中 Ribavirin 濃度の与える影響を検討した。当院および関連施設で治療を行った 118 例中 40.6%に Ribavirin の投与中止減量がみられたが、Ribavirin の投与量が予定投与量の 60%以上であれば良好な治療効果が得られた。治療開始 1 週目の血中 Ribavirin 濃度が 1600mg/dL 以上の場合 55%の症例で、また、8 週目の血中 Ribavirin 濃度が 3200mg/dL 以上の場合 53%の症例で Ribavirin の投与中止・減量がみられた。Ribavirin の血中濃度は 600mg 投与群および 800mg 投与群の体重の軽い症例で高くなった。治療中副作用が出た場合早期に減量し、治療を継続することが重要である。

共同研究者

田中榮司 信州大学医学部消化器科 助教授
松本晶博 信州大学医学部消化器科 助手

する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。またこの臨床研究は当院の倫理委員会で検討され承認を得ている。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎に対する IFN・ribavirin (RBV)併用療法では高率に IFN または Ribavirin の中止・減量が見られる。中止・減量による治療効果への影響と治療中の血中 Ribavirin 濃度の変化を測定し、RBV 投与量の調節の指標になるかどうか検討した。

B. 研究方法

IFN α -2b+Ribavirin 併用療法 (24 週間投与)
当科および関連施設において C 型慢性肝炎と診断された HCV 高ウイルス量 (1 MEq/mL 以上、あるいは 100 KIU/mL 以上) かまたは過去の IFN 治療で著効が得られなかった患者で、2001 年 12 月より 2003 年 5 月までに IFN α -2b+Rib 併用療法 (24 週間投与)を導入した 118 例を対象とした。対象は 27 から 70 歳 (中央値 58 歳)、男性:女性=62:56、IFN 治療歴 48.3%、genotype 1 型:1 型以外=73:45、治療前血清 HCV RNA 量 3.9 から >850 KIU/mL (中央値 675 KIU/mL)であった。投与方法は IFN α -2b 6MU または 10MU/日・筋注を連日 2 週間後週 3 回間歇 22 週間投与、Ribavirin は 600 mg/日 (体重 60 kg 以下) または 800mg/日 (体重 60 kg 超) 分 2 回・経口・連日 24 週間投与とした。Hb 値が 10 g/dL 未満で 200 mg 減量、8.5 g/dL 未満で投与中止とした。各症例について治療開始 1 週目および 8 週目の血中 Ribavirin 濃度を測定した。投与終了 24 週目に HCV-RNA が陰性であるものをウイルス学的著効(SVR)、ALT が 50IU/L 未満のものを生化学的著効(SBR)とした。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関

C. 研究結果

治療導入 118 例中、Ribavirin を減量せずに予定通りの治療を完遂した症例は 70 例 (59.6%)、減量例は 26 例 (22.0%) 中止例は 5 例 (4.2%)、IFN 中止に伴う中止例は 17 例 (14.4%) であり、40.6%に中止減量がみられた。減量理由は 21 例が溶血性貧血であり、4 例が全身倦怠感、1 例が消化器症状であった。中止理由は IFN の中止に伴うものが 17 例、溶血性貧血が 4 例、全身倦怠感が 1 例であった。減量中止は投与開始 8 週目から観察され、投与終了直前までみられた。治療開始前の Hb が 13.5g/dL 未満の群では 70 に Ribavirin の減量・中止が見られた。

治療完遂例では SVR 36.5%、SBR 25.4%であり、減量群では SVR 54.8%、SBR 22.6%、IFN 中止例では

SVR 15%、SBR 30%、Ribavirin 中止例では SVR 20%、SBR 40%であり、中止群で有意に SVR 率が低かった。また、Ribavirin の率を 1 群:100%、2 群:80%以上 100%未満、3 群:60%以上 80%未満、4 群 60%未満に分けて比較すると、SVR 率はそれぞれ 37, 36, 75, 14%であり、60%以上の投与率であれば良好な結果が得られていた。

血中の Ribavirin 濃度を 1 週目および 8 週目で比較してみると、 $r=0.279$ 、 $p=0.027$ 、[8 週目の血中 ribavirin 濃度]= $0.54 \times [1 週目の血中 ribavirin 濃度]+1964$ であり、有意な相関がみられた。また、1 週目の血中 ribavirin 濃度が 1600mg/dL を超えた例ではその 55%で中止または減量がみられ、8 週目の血中 Ribavirin 濃度が 3200mg/dL を超えた例で

は53%に中止減量がみられ、1週目および8週目ともに閾値以下の場合の中止減量率29%に比べて有意に高率であった(p<0.05)。また、体重と血中濃度を比較してみると、体重の低い例で血中濃度が高くなる傾向があったが、有意ではなかった。減量中止例も体重の低い人に多い傾向にあったが有意ではなかった。

D. 考察

今回の研究ではRibavirinの投与率が6割を超えていれば良好な治療効果が得られており、副作用が現れた場合は、早めに減量して治療を継続することが望ましいと思われる。Ribavirinの減量中止は投与開始前のヘモグロビン量が強く関連していたが、Ribavirinの血中濃度が高いほど中止減量に至る例は多く、血中のRibavirin濃度を測定することにも意義はあると思われる。

E. 結論

IFN α -2b+Ribavirin併用療法においては、開始時のヘモグロビンが低い人や投与中の血中Ribavirin濃度が高い例では、副作用が現れた場合早めにRibavirinを減量して、治療を継続することが重要である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 学会発表

松本晶博、田中榮司、清澤研道：C型慢性肝炎のIFN・ribavirin併用療法に期待される治療効果と問題点 第8回日本肝臓学会大会、福岡、2004年10月。

2. 論文発表

1) Kiyosawa K, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Gad A, Tanaka E. Hepatocellular carcinoma : recent trends in Japan. Gastroenterology 2004;127:S17-S26.

2) Muto H, Tanaka E, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K. Types of human leucocyte antigen and decrease in HCV core antigen in serum for predicting efficacy of interferon- α in patients with chronic hepatitis C: analysis by a predictive study. J Gastroenterol 2004;39: 674-680.

3) Makiyama A, Itoh Y, Kasahara A, Imai Y,

Kawata S, Yoshida K, Tsubouchi H, Kiyosawa K, Kakumu S, Okita K, Hayashi N, Okanoue T.

Characteristics of patients with chronic hepatitis C who developed hepatocellular carcinoma after a sustained response to interferon therapy. Cancer 2004;101:1616-1622.

4) Imai Y, Kasahara A, Tanaka H, Okanoue T, Hiramatsu N, Tsubouchi H, Yoshioka K, Kawata S, Tanaka E, Hino K, Hayashi N, Tamura S, Itoh Y, Sakai Y, Kiyosawa K, Kakumu S, Okita K, Hayashi N. Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. J Gastroenterology 2004; 39: 1069-1077.

5) Tanaka N, Kiyosawa K. Phlebotomy: a promising treatment for chronic hepatitis C. J Gastroenterol 2004;39:601-603.

6) Tanaka N, Ishida F, Tanaka E. Ribavirin-induced pure red-cell aplasia during treatment of chronic hepatitis C. N Engl J Med 2004; 350: 1264-1265.

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

8) Yoshizawa K, Gad A, Kiyosawa K. Fatal neonatal hepatitis C: uncommon but important. Hepatology Res 2004;30:189-191.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

Genotype 2 の C 型慢性肝炎に対する Interferon・Ribavirin 併用療法の効果規定因子

分担研究者 四柳 宏 聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科（現東大感染制御部）

研究要旨：HCV genotype 2 かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する Interferon (IFN) α -2b+Ribavirin 併用療法の効果規定因子に関する検討を行った。Genotype 2 の症例 33 例（2a 21 例、2b 12 例）に 24 週間の IFN α -2b+Ribavirin 併用療法の完全著効率は 79%であった。単変量解析による完全著効に関与する因子の解析では HCV-RNA 量が有意な因子であった。治療 4 週後の血中リバビリン濃度も治療効果に影響を及ぼすことが示唆された。

共同研究者

長瀬良彦	聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科
奥瀬千晃	聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科
鈴木通博	聖マリアンナ医科大学 消化器・肝臓内科 教授

(1) IFN α -2b+Ribavirin 併用療法（24 週間投与）

治療前に施行した肝生検の Grade は A1 20 例、A2 10 例、A3 1 例であった。また、Stage は F1 15 例、F2 9 例、F3 7 例であった。

IFN α -2b+Ribavirin 併用療法の治療効果は、完全著効（投与終了時及び 24 週後の血清 HCV RNA が共に陰性）26 例（genotype 2a 17 例、genotype 2b 9 例）、一過性有効（投与終了時血清 HCV RNA 陰性、投与終了 24 週後血清 HCV RNA 陽性）7 例（genotype 2a 4 例、genotype 2b 3 例）であり、完全著効率は 79%であった。

完全著効群と一過性有効群との間で、genotype、年齢、性、治療前肝生検所見、HCV RNA 消失時期を比較したが、両群間に差は認められなかった。治療前 HCV RNA 量は完全著効群 434 \pm 296 KIU/ml、一過性有効群 691 \pm 163 KIU/ml であり、完全著効群で低値であった（ $p=0.04$ ）。また、投与 4 週後の血清リバビリン濃度は、完全著効群 2425 \pm 628 ng/ml、一過性有効群 1755 \pm 200 ng/ml であり、完全著効群で高値であった（ $p=0.03$ ）。

(2) ISDR (Interferon Sensitivity Determining Region)

ISDR のアミノ酸配列は 29 例で決定可能であった。完全著効群では Wild（アミノ酸変異なし）6 例、Intermediate（アミノ酸変異 1-3 箇所）10 例、Mutant（アミノ酸変異 4 箇所以上）6 例であった。一方一過性有効群では Wild 5 例、Intermediate 2 例、Mutant の症例はなく、ISDR の変異が多い症例で完全著効に入りやすいことが示された（ $p=0.04$ ）。なお、ISDR の変異数と HCV RNA 量との間には相関は認められなかった（ $r=0.424$ ）。

D. 考察

(1) IFN α -2b+Rib 併用療法（24 週間投与）における完全著効率は 79%であり、約 2 割の症例では HCV RNA は一過性に消失するものの、再出現した。

(2) 完全著効に寄与する因子として、治療開始前 HCV RNA 量と治療 4 週後の血中リバビリン濃度が挙げられた。治療期間が 24 週と短いことを考えると、HCV 量の多い症例では早期にリバビリンの血中濃度を上げて、十分な抗ウイルス効果を持続させる必要がある

A. 研究目的

IFN α -2b+Ribavirin 併用療法は HCV genotype 2 の症例に対しては高い効果を示すことが知られている。しかし 24 週の併用療法ではウイルスの排除されない症例も少なからず存在し、その原因の究明は重要なことと考えられる。今回この点に関し、検討を行った。

B. 研究方法

(1) IFN α -2b+Ribavirin 併用療法（24 週間投与）

当科及び関連施設で C 型慢性肝炎と診断された HCV genotype 2 かつ高ウイルス量（Amplicor Monitor Ver.2 で 100 KIU/mL 以上）の患者で、2001 年 12 月より 2003 年 1 月までに IFN α -2b+Rib 併用療法（24 週間投与）を導入し、治療終了 24 週後における効果判定が可能であった 33 例を対象とした。対象は 28-68 歳（中央値 52 歳）、男性:女性=18:15、治療前血清 HCV RNA 量 10-850 KIU/mL（中央値 530 KIU/mL）であった。投与方法は IFN α -2b 6MU/日・筋注を連日 2 週間後週 3 回間歇 22 週間投与、Rib は 600 mg/日（体重 60 kg 以下）または 800mg/日（体重 60 kg 超）分 2 回・経口・連日 24 週間投与とした。Hb 値が 10 g/dL 未満で rib 200 mg 減量、8.5 g/dL 未満で投与中止とした。

(2) ISDR (Interferon Sensitivity Determining Region)

NS5A 領域に設定したプライマーを用いて RT-nested PCR を行い、産物の塩基配列を Direct Sequencing を用いて決定した後、ISDR のアミノ酸配列を決定した。

C. 研究結果

ことが示唆された。

(3) ISDR が Wild type の場合、Intermediate type の場合、Mutant の場合それぞれにおいて完全著効に至った割合は 55%、83%、100%であり、変異型の著効率は高いことが示された。Interferon 単独療法の治療効果予測因子として、ISDR の変異が Genotype 1、Genotype 2 共に重要であることが示されている。また、ISDR は Interferon と Ribavirin の併用療法の場合も効果予測因子となり得ることが、Genotype 1 に関して海外から報告されているが、今回の検討で、Genotype 2 においても ISDR は予後予測に有用であることが示された。ISDR が野生型の場合は、IFN α -2b+Rib 併用療法の期間を延長することも考慮すべきだと思われた。

E. 結論

IFN α -2b+Rib 併用療法の効果予測因子として、治療前ウイルス量、投与開始 4 週後の血中リバビリン濃度が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagase Y, Yotsuyanagi H, et al. (in submission).

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型慢性肝炎に対するIFN α -2b+Ribavirin併用療法の治療効果とNS5B領域の変異との関係についての検討

分担研究者 折戸悦朗 名古屋市立大学大学院臨床分子内科講師

研究要旨：C型慢性肝炎に対するInterferon+Ribavirin併用療法の治療効果とウイルスの複製酵素をコードするNS5B領域の変異との関連について検討した。著功群、再燃群、無効群を含む18例において、治療前、治療直後のNS5B領域のアミノ酸配列を直接法にて決定したところ、治療前のアミノ酸変異と治療効果との関連は認められなかった。さらに、再燃群と無効群については、治療直後でのアミノ酸配列も検討したが、特異的な変異は見られなかった。特に415番目のアミノ酸はリバビリンに対する耐性化との関連が指摘されているが、1b型の症例ではもともと耐性型であり、併用療法における治療効果に対する影響は認められなかった。今後NS5B以外の他の領域の変異や、ホストの免疫力和併用療法の効果との関連について、さらに検討していく必要があると考えた。

共同研究者

杉原寛治 名市大大学院臨床分子内科医員
田中靖人 名市大大学院臨床分子情報医学講師

A. 研究目的

最近リバビリン(Rib)単独療法において、HCV genotype 1a型のウイルス複製酵素をコードしているNS5B領域の415番目のアミノ酸がFからYに変異するとRib治療に対し耐性化を獲得するという報告が出された(Young KC, et al. Hepatology 2003;38:869-878)。そこで今回日本で7割以上を占める1b型患者において、Interferon alfa 2b(IFN)+Ribの併用療法時にこのような変異がみられるかどうか、また治療効果に対する影響はどうかを検討した。

B. 研究方法

(1) 対象症例

HCV genotype 1b型でかつ高ウイルス量のC型慢性肝炎患者にIFN+Rib併用療法(24週)を施行された18例と、過去にIFN単独療法(24週)を投与された5例を対象とした。全例治療前HCV RNAは持続陽性で、かつHBs抗原は陰性である。投与スケジュールはIFNについては、併用療法、単独療法ともにIFN-alfa-2bを600MU2週連投後、600MUを週3回22週間投与した。併用療法群では、Ribを体重により1日600mgから800mgを連日24週間投与した。治療終了後24週間後にウイルスの消失が確認できた群をSVR群、治療中はウイルスが消失したが治療後再燃した群をRel群、それ以外をNR群とした。

(2) 方法

IFN+Rib併用群、IFN単独群において、治療前、および治療直後の血清を用いて全NS5B領域をPCRにて増幅し、direct sequencingにて塩基配列を決定した。

C. 研究結果

(1) 治療前のNS5B領域のアミノ酸変異と治療効果

治療前の全NS5B領域の塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列を治療効果別に比較検討したところ、SVR

群、Rel群、NR群それぞれにおいて特異的なアミノ酸配列は見られなかった。またIFN+Rib併用群でも、IFN単独療法群であっても、差は見られなかった。また、Rel群とNR群については、治療前と直後のアミノ酸配列を検討し、治療抵抗性との関与が示された415番目のアミノ酸の変異についても検討したが、同部位は治療前より全例リバビリン耐性型のYであり、治療終了直後も変異は見られなかった。また、非特異的に散見されたアミノ酸変異は、すべてHCVのRNAポリメラーゼの最も重要な保存された領域以外であった。

(2) データベース上での415番目のアミノ酸残基について

DDBJ/GenBankに登録されているNS5B領域の415番目のアミノ酸について、HCV genotype 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6型のすべてを含む160株を調べた。その結果、1a型は100%Fでリバビリン感受性型であったが、1b型は98%がYでリバビリン抵抗性型であった。また、その他日本で見られる2a, 2b型もやはり100%Yでリバビリン抵抗性型であった。

D. 考察

(1) リバビリン単独治療においては、NS5B領域の415番目のアミノ酸がFであれば感受性型であり、Yであれば抵抗性型であることが示されているが、日本ではリバビリンが単独で使用されることはなく、IFNとの併用となる。IFNとの併用で415番目のアミノ酸の変異の有無と治療効果との関連については、まだ報告されていない。今回の検討では、日本で最も見られる1b型高ウイルス量症例について検討したところ、全例治療前から抵抗性型であるYであり、すべてのNS5B領域の検討でも治療効果と関連する特異的な変異は認めなかった。

(2) データベースに登録されているすべてのgenotypeにおいても415番目のアミノ酸を検討したところ、これがリバビリン感受性型であるFを持つものは1aと1c型だけであった。しかし、併用療法においては、たとえ抵抗性型のYを持っていても、1b型と同じような著効率が得られているので、併用による強力な治療においては、415番目のアミノ酸の影響

は非常に少ないと考えた。

E. 結論

リバビリンがどのように抗ウイルス効果を発揮しているのかについては、未だ明確ではない。直接的なウイルスの増殖抑制効果はやはり軽微であり、ウイルスの変異による影響は少ないと考える。むしろ宿主のウイルスに対する免疫力の増強が主たる作用であると思われる。さらに、リバビリンの *mutagen* としての作用についても不明であるが、今回の検討からは、特異的な変異は見られなかった。今後 IFN との併用によるリバビリンの抗ウイルス効果増強作用のメカニズムについて、さらに詳細な検討が必要であると考えた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirashima N, Orito E, Ohba K, Kondo, Sakamoto T, Matsunaga S, et al. A randomized controlled trial of consensus interferon with or without lactoferrin for chronic hepatitis C patients with genotype 1b and high viral load. *Hepatol Res* 2004;29:9-12.

2) Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Kato T, Sugauchi F, et al. Lack of association between occult hepatitis B virus DNA viral load and aminotransferase levels in patients with hepatitis

C virus-related chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:1343-1347.

2. 学会発表

1) 田中靖人、加藤孝宣、折戸悦朗、大野智義、杉原寛治、溝上雅史. C型慢性肝炎に対するRibavirin単独療法におけるHCV遺伝子変異パターンの検討.

第40回日本肝臓学会総会、東京、平成16年6月3日

2) Sugihara K, Orito E, Tanaka Y, Ohno T, Kato T, Mizokami M. Mutation of the NS5B region in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection: response to interferon alfa 2b and ribavirin. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, October 29-November 2, 2004.

3) Kato T, Date T, Miyamoto M, Tanaka Y, Orito E, Mizokami M, Wakita T. In vitro anti-viral effects of interferon and ribavirin at their clinical concentrations against hepatitis C virus. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, October 29-November 2, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

高齢者 C 型慢性肝炎の抗ウイルス療法

分担研究者 山田剛太郎 川崎医科大学附属川崎病院 肝臓・消化器病センター長

研究要旨：急速に増加している高齢 C 型慢性肝炎患者例に対して病期診断を的確に行い、ハイリスク群に対しては発がん抑制のためにどのような IFN 治療を選択するか検討する必要がある。高癌化状態を改善するための効果的かつ副作用の少なく QOL を維持できる治療法として IFN 少量長期投与およびペグ化 IFN 投与の有用性を検討した。

共同研究者

戸川三省 川崎医科大学附属川崎病院 肝臓・消化器病センター内科副部長
新山豪一 川崎医科大学附属川崎病院 肝臓・消化器病センター内科副部長

A. 研究目的

増加している高齢（65 歳以上）C 型慢性肝炎患者例の IFN 治療の目的、適応、投与方法、効果について検討を行った。

B. 研究方法

（1）当センターで 65 歳以上で組織診断が得られた C 型慢性肝炎患者例 32 例を対象に、IFN 通常単独投与群（17 例）と非投与群（15 例）にわけ治療効果と予後（観察期間 6.2±4.1 年）を検討した。

（2）高齢、線維化進行、IFN 難治（タイプ 1 高ウイルス量）、ALT 高値に代表される発癌ハイリスクが想定される 65 歳以上の 15 症例[年齢 68.7±2.2、男/女:3/12、タイプ(1/2):14/1、ウイルス量(H/L):15/0、ALT84±49、F(1/2/3/4):0/2/5/8]に対して ALT 持続安定化（50 以下）目標に IFN 少量長期投与（IFN- α 2.5M 週 2-3 回を 12 ヶ月以上投与）を行い、副作用、肝機能（ALT、PT）について検討した。

（3）pegIFN α -2a の投与を開始し、6 ヶ月以上経過した 65 歳以上の症例（90 μ g:26 例, 180 μ g:9 例）について、治療の継続、副作用、肝機能を検討した。

C. 研究結果

（1）高齢症例に対する IFN 通常単独療法の予後 IFN 通常単独投与群（17 例）と非投与群（15 例）にわけ治療効果と予後（観察期間 6.2±4.1 年）を検討した。SVR 例は 6 例（35%）でいずれも低ウイルス量であった（タイプ 1 低ウイルス量 1 例、タイプ 2 低ウイルス量 5 例）。タイプ 1 高ウイルス量例はすべて NR であった。低ウイルス量例では高齢者であっても SVR が十分期待できる。予後については HCC 発症は 8 例（投与 4 例、非投与 4 例）、非代償性肝硬変への進行は 4 例（投与 1 例、非投与 3 例）、肝関連死は 5 例（投与 1 例、非投与 4 例）で、いずれも IFN 投与群と非投与群で差は認めなかった。一方、線維化ステージ別では F4 症例は F1-3 症例に比して生存予後は不良であった（ $p < 0.05$: Log-rank test）。

（2）高齢症例に対する IFN 少量長期投与

開始後大きな副作用は認めず、軽度の血小板低下は有意に認めるが、15 例全例で 12 ヶ月投与継続可能であった。持続ウイルス陰性化は 1 例に認めた。発癌は 1 例（投与 12 ヶ月後）に認めた。ALT は開始時（84±49U/l）と比べて 6 ヶ月後（47±25）、12 ヶ月後（39±28）で有意に低下し（ $P < 0.01$ ）、10 例（66%）に ALT 持続安定（50 以下）を認めた。PT も開始時（69±16%）と比べて 6 ヶ月後（80±15）、12 ヶ月後（88±9）で有意な改善が認められた（ $P < 0.01$ ）。

（3）高齢症例に対する pegIFN α -2a の投与

投与開始して 6 ヶ月以上経過した pegIFN α -2a 90 μ g 群（26 例）では初期量継続は 70%（18 例）、減量 15%（4 例）、中止 15%（4 例 内 2 例は発癌による）だったが、180 μ g 群では初期量継続は 22%（2 例）、減量 67%（6 例）、中止 11%（1 例）だった。ALT 安定化率（ALT < 50）は 6 ヶ月経過時では 90 μ g 群では 24%、180 μ g 群では 64%だが、12 ヶ月経過時では 90 μ g 群では 43%、180 μ g 群では 50%で、投与期間の延長とともに 90 μ g 群で安定化する症例が増加した。

D. 考察

65 歳以上の高齢 C 型慢性肝炎に対する IFN 通常単独治療例では IFN 投与群と非投与群では発癌、非代償性肝硬変への進行、肝関連死ではいずれも有意な差は認められなかった。一方 F4 症例は F1-3 症例に比して生存予後は不良であった。これらは少数例についての検討であり、さらに十分な検討がなされなければならないが、高齢者であっても肝硬変への進行を遅らせることが生命予後の改善につながると考えられる。以上の観点から、肝硬変への進展予防および発癌予防を目的とした、副作用を軽減し長期にわたる抗ウイルス療法を試みる意味は十分あると考えられる。IFN 少量およびペグ化 IFN 少量投与は高齢者においても投与の長期継続は可能で、ALT 安定化に有用と考えられた。今後はさらに、高齢で線維化の進行したハイリスク群に対して発癌抑制効果が得られるためには ALT

安定化で十分なのか、ALT 安定化を得るには投与期間はどのくらい必要か、ALT 安定化が得られた後も継続投与すべきか、一旦中止してよいのかなどの検討が必要である。

E. 結論

肝硬変への進展予防および発癌予防を目的とした、副作用の少ない長期にわたり投与可能な抗ウイルス療法として、IFN 少量長期投与およびペグ化 IFN 少量長期投与は、高齢者においても長期の継続は可能で、ALT 安定化に有用と考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山田剛太郎 : 高齢者の急性肝炎/慢性肝炎の特徴. 肝胆膵 40 : 695-700, 2000.
- 2) 戸川三省、山田剛太郎 : 高齢者 C 型慢性肝疾患へのインターフェロン治療. 肝胆膵 45 : 1033-1038, 2002.
- 3) 戸川三省、山田剛太郎 : 高齢 C 型慢性肝疾患の治療 - 発癌抑制と QOL 維持を目指して -. 肝胆膵 49 : 1015-1020, 2004.
- 4) 岡本華枝、他 : C 型慢性肝炎の PEG-INTERFERON α -2a 単独治療における健康関連 QOL の検討 - SF-36 による測定 -. 肝胆膵 50 (2) : 387-394, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業臨床班

分担研究報告書

「IFN 著効例からの肝発癌に関する検討」

分担研究者 西口修平 大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科 助教授

研究要旨： 今年度の研究では、C型慢性肝炎患者におけるインターフェロン(IFN) 著効例からの肝発癌の特徴を明らかにするため当教室と関連施設における SVR 症例を調査し、肝発癌例の病態を解析した。17 例の SVR 例に肝発癌を認めた。肝癌の診断時平均年齢は 62.7 歳、男性 16、女性 1 例であった。IFN 終了時から肝癌診断までの期間は平均 45.4 ヶ月であった。除去された HCV の genotype は 1b;6 例、2a;10 例、2b;1 例。IFN 投与前の肝生検に肝線維化程度と肝癌までの期間はそれぞれ F1;31.7 ヶ月、F2;52 ヶ月、F3;46.8 ヶ月、F4;44.5 ヶ月であった。この中で肝切除された 7 症例を対象として肝癌組織の解析を実施した。全例男性。手術時平均年齢 62 歳 (59-66)。IFN 終了から肝癌切除日までは平均 45 ヶ月 (13-103)。3 例は常習飲酒家であり残り 4 例には飲酒歴はなかった。BMI 25 (kg/m²) を超える肥満者はなく糖尿病例もなかった。切除肝組織では 4 例に HBV DNA を検出しその内 2 例では cccHBV DNA を検出した。この 4 例では肝癌組織において HBV DNA のヒトゲノムへの組み込みを認めた。組み込まれた染色体は 11q12, 11q13, 11q22, 14q32, 22q11 であった。HBV DNA の組み込み群と非組み込み群を比較すると IFN 終了から発癌までの期間は前者で有意に長く (61 ヶ月 vs 18 ヶ月)、また周辺肝の線維化は軽度であった。今回、検討した SVR 肝発癌例において IFN 治療前の肝線維化程度と肝発癌までの期間に相関はなかった。また一部の SVR 肝癌において OccultHBV 感染の存在が確認された。

共同研究者

田守昭博 大阪市立大学肝胆膵病態内科学
講師

を明らかとするため IFN 治療前の患者背景を含め発癌に関与する因子 (特に Occult HBV 感染の有無) を解析し、今後の SVR 例経過観察の対策について検討した。

B. 研究方法

A. 研究目的

昨年末のペグイントロンとリバビリンの併用療法の保険収載により C 型慢性肝炎患者における抗ウイルス療法の著効率が 50% を越えることが期待されている。このような HCV 除去例 (SVR) からの肝発癌は極めて稀であることが報告されている。しかし多施設から SVR 経過中に肝癌を診断したとする報告があり中には IFN 終了後 5 年以上経過してからの症例もある。そこで今回 SVR 例からの肝発癌の病態

I. 本教室と関連施設にアンケート調査を行い SVR 例からの発癌症例の抽出をおこなった。その対象例について IFN 治療前の HCV 量、genotype、肝生検所見また IFN 終了後の通院状況を調査した。

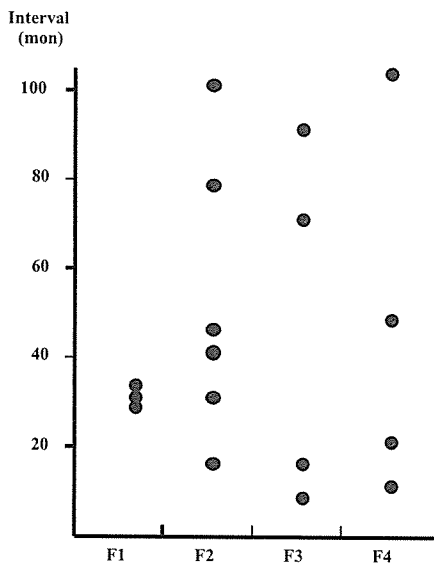
II. 外科切除例 7 例については切除肝組織の病態を評価した。患者血清、切除肝組織中の HBV DNA の有無を PCR にて検討した。また HBV DNA の組み込みについてはカセットライゲーション法にて検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を取り扱いには、ヘルシンキ宣言と大阪市立大学医学部倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

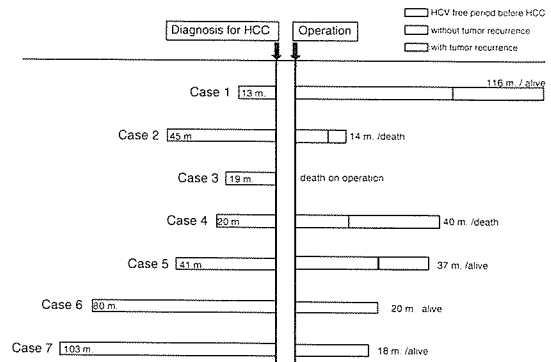
I. SVR 例中の 17 例に肝発癌を認めた。肝癌の診断時平均年齢は 62.7 歳、男性 16、女性 1 例であった。IFN 終了時から肝癌診断までの期間は平均 45.4 ヶ月であった。除去された HCV の genotype は 1b;6 例、2a;10 例、2b;1 例。IFN 投与前の肝生検に肝線維化程度と肝癌までの期間はそれぞれ F1;31.7 ヶ月、F2;52 ヶ月、F3;46.8 ヶ月、F4;44.5 ヶ月であった。すなわち肝線維化の程度と肝発癌までの期間との間には相関はなかった。



II. 外科切除例 7 例における検討

対象とした 7 例は全例男性。手術時平均年齢 62 歳 (59-66)。IFN 終了から肝癌切除日までは平均 45 ヶ月 (13-103)。3 例は常習飲酒家であり残り 4 例には飲酒歴はなかった。BMI 25 (kg/m²) を超える肥満者はなく糖尿病例もなかった。4 例が HBs 抗体陽性であった。血清 HBV DNA の検出例はなかった。切除肝組織では 4 例に HBV DNA を検出しその内 2 例では cccHBV DNA を検出した。この 4 例では肝癌組織において HBV DNA のヒ

トゲノムへの組み込みを認めた。組み込まれた染色体は 11q12, 11q13, 11q22, 14q32, 22q11 であった。HBV DNA の組み込み群と非組み込み群を比較すると IFN 終了から発癌までの期間は前者で有意に長く (61 ヶ月 vs 18 ヶ月)、また周辺肝の線維化は軽度であった。



D. 考察

SVR 症例を長期観察した成績では、2.5-4.2% に肝発癌が起こることが報告されている。我々の施設においても定期的な経過観察 SVR 例 342 人中 7 例の肝癌を経験している。これら発癌例では IFN による HCV 排除以前にすでに sub-clinical な肝癌が存在し長期間を有して臨床的に診断される腫瘍に至ったものと考えられてきた。しかし多数例の SVR 肝癌を検討すると IFN 治療前の肝線維化程度と発癌までの期間に相関はなく、前癌病変の存在する可能性の低い F1 症例からも肝癌が発生しており、IFN 治療前の sub-clinical 肝癌の存在に疑問が生じる。我々は切除 SVR 肝癌の解析からその発症に HBV の組み込みが関与している可能性を報告した。このことは非 B 非 C 肝癌に Occult HBV 感染が関与していることを示唆する多くの成績と類似したものとする。SVR 症例を如何に経過観察し早期に肝癌を発見するのかが今後の課題であるが、自験例も含め幾つかの報告を検討してもその特徴は高齢、男性であること以外に共通の因子はなく効率良く肝癌検診を実施する high risk を規定するには至っていない。