

感染に対する、何らかの prophylaxis あるいは post transplant treatment の strategy を確立することが急務となってきた。

著者は2005年6月、日本肝移植研究会で基調講演を依頼された際に、幾つかの報告をまとめ、我が国におけるHCV陽性肝移植レシピエントの再感染とその病態の進展に関する最新の状況をまとめた。はたして我が国におけるHCV陽性レシピエントの病態が欧米でうたわれているような病態に陥っているかどうか、著者らの考えを述べることにする。

### 1. HCVの再感染と肝炎発症

肝移植手術数時間後からのHCVのダイナミックな複製開始が知られている<sup>7)</sup>。その後、組織学的には早い症例で1週間目から肝炎の所見が見いだされ<sup>8)</sup>、その病理学的特徴はacidophilic bodyやpiecemeal壊死などがあげられる<sup>9)</sup>が、臨床の現場では、必ずしも拒絶反応とこの肝炎の組織診断、鑑別診断が容易になされているとは到底思えない。更に、関連した報告をまとめても、HCVの再感染とHCVによる肝炎発症とそれぞれ明確にされず、その区別ははなはだ困難である。なぜならば、血中トランスアミナーゼ値の動揺は薬剤性肝障害、拒絶、感染症などで認められ、それらに起因するものか、肝炎によるものかは組織診断でないと確定診断が成されないからである。臨床的に顕著となったHCV再感染による肝炎といわゆる他の要因が主たる無症候性HCVキャリアの区別は肝移植後の臨床の間では、明確に区別することが困難である。

### 2. HCVレシピエントの肝移植後の臨床経過

肝移植後のHCV陽性レシピエントは以下の4群に分けられる。①再感染後、トランスアミナーゼ値の動揺は軽微で、通常みられるC型慢性肝炎と同様の臨床経過をたどる例と、②短期間に肝硬変に進展し、早期に非代償性肝硬変まで進行する例<sup>2,4,10,11)</sup>が存在し、5年間で8-25%は肝硬変へ進展する<sup>12)</sup>群が存在するとされている。更に、③肝移植後、早期にHCVの顕

著な増殖とともに胆汁うっ滞と進行性の線維症をみるfibrosing cholestatic hepatitis(FCH)や重症型肝炎の像を呈する例などにその臨床経過は分けられる。そして、④数パーセントの症例であるが、なんら対処しなくても感染から免れる例もわずかながら存在する<sup>13,14)</sup>。

欧米の報告をまとめると、通常、肝移植後、肝硬変へ進展する頻度は5年間で20-30%<sup>15)</sup>と極めて高率である。更に、平均45カ月の観察で約半数が肝炎の再発を認め、1/3が肝硬変へ進展した<sup>16)</sup>とする報告もある。特に、ドナーの年齢が40歳以下と50歳以上で線維化の進展は異なり、平均7.7年で肝硬変へ進展したレシピエントは高齢者の場合は更に早く2.2年の進行度であったとされている<sup>17)</sup>。すなわち、移植後、HCV再感染を生じたレシピエントは肝硬変への進展が極めて早いことが認識され出した。このことは1990年以降、HCVレシピエントの再移植例が増加している事実<sup>10)</sup>と合わせると、その事態の深刻さが理解されるであろう(図1)。このようにいったん、HCVに再感染し、慢性肝炎に陥ったレシピエントは通常の慢性肝炎と異なり、肝硬変への進展が極めて早いことは驚くべき事実である。

### 3. 重症化、線維化進展、硬変化の要因

#### a. 我が国における生体肝移植のHCVレシピエントの成績

中澤らが肝臓学会 Single Topic Conferenceでまとめた我が国の生体肝移植HCVレシピエントの成績からみると、200例のレシピエントの生存率は1年78.8%、2年71.8%、4年68.2%であった<sup>18)</sup>(図2)。一方、日本肝移植研究会の報告では、HCVレシピエント114例の生存率は1年生存76.0%、3年生存72.7%、5年生存65.4%であり、18歳以上成人1,365例の生存率、1年生存76.9%、3年生存72.7%、5年生存70.3%、10年生存69.5%に比べると、その生存率は劣っていることが判明した(図3)<sup>19)</sup>。

この場合、一つの要因として肝細胞癌の関与が生存率に影響を及ぼしていると思われたが、日本肝移植研究会の肝細胞癌315例(うちHCV

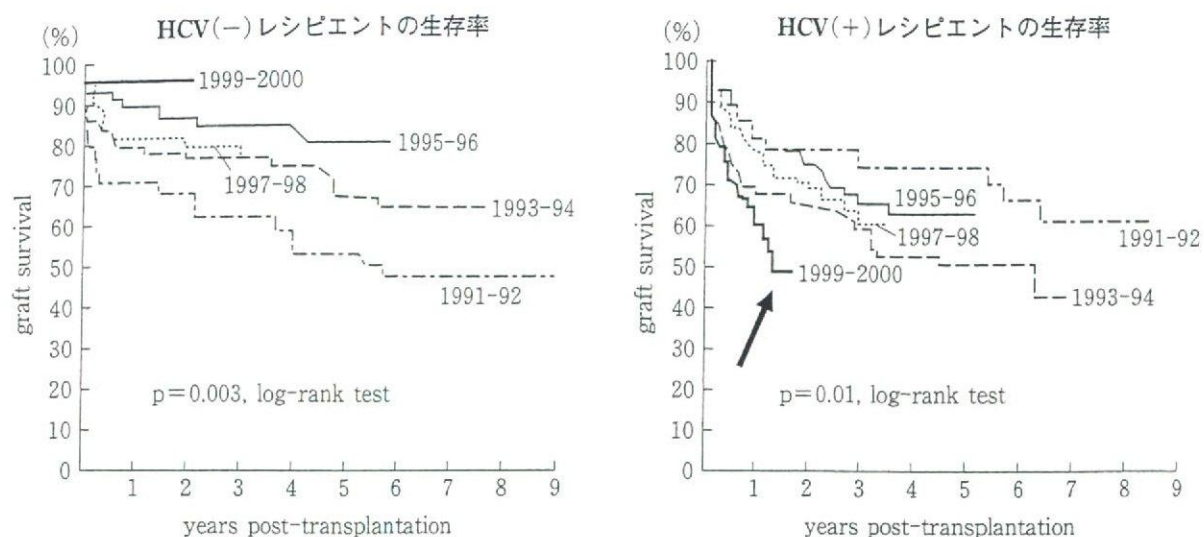


図1 HCV陽性，陰性別肝移植レシピエントの生存率<sup>10)</sup>

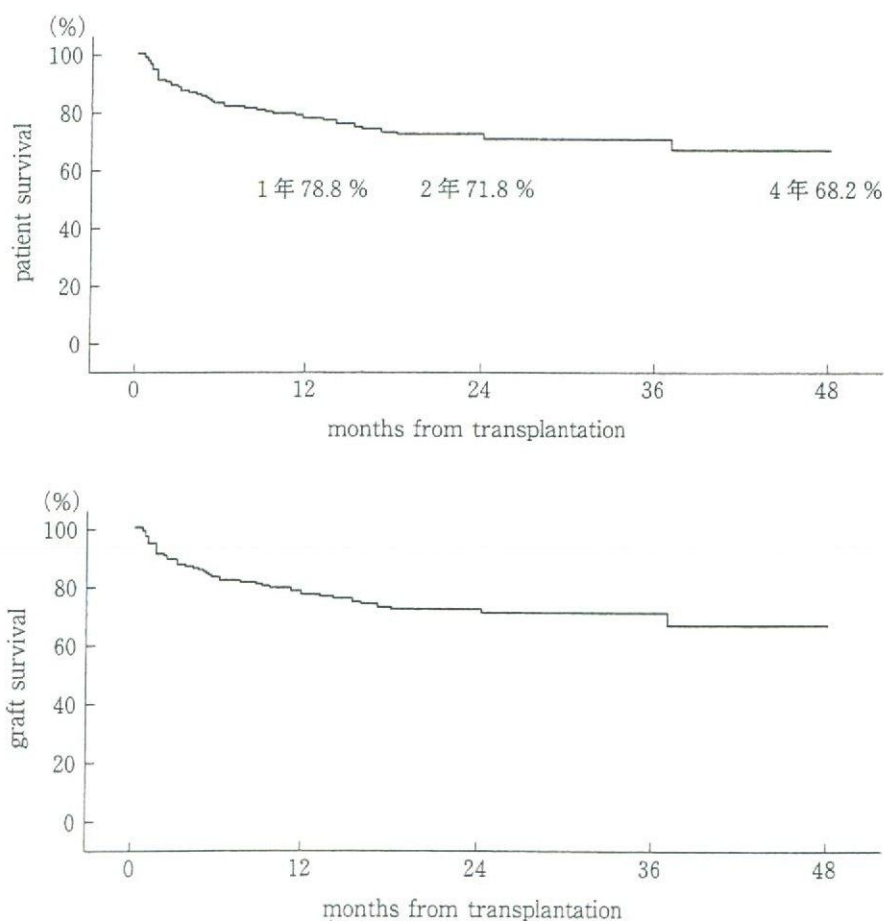


図2 HCV陽性レシピエントの生存率とグラフト生着率(中澤報告より)

陽性36%)の1年生存77.6%，3年生存66.9%，5年生存63.8%，10年生存42.5%の成績や，藤堂らの我が国の肝細胞癌221例(うち59%)の

1年生存80%，3年生存77%，4年生存77%の成績との比較検討から，肝細胞癌がHCVレシピエントの生存率に影響を及ぼしているとは考

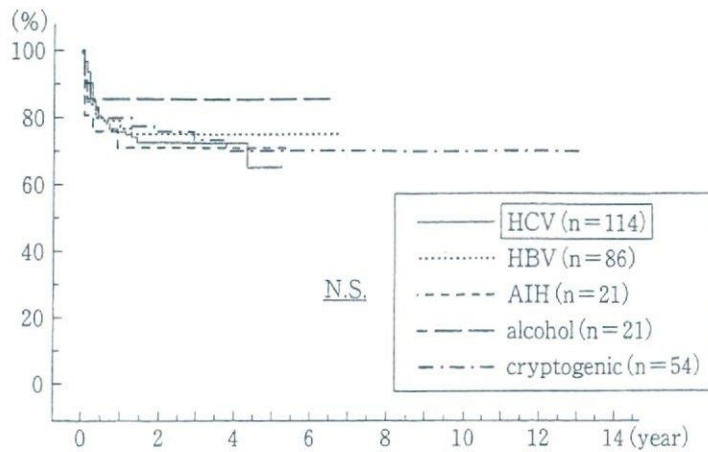


図3 日本肝移植研究会登録症例の生存率

HCV: C型肝炎ウイルス陽性肝硬変, HBV: B型肝炎ウイルス陽性肝硬変, AIH: 自己免疫性肝硬変, alcohol: アルコール性肝硬変, cryptogenic: 原因不明肝硬変

えられなかった。

すなわち、この3つの報告をまとめると、HCV陽性レシピエント114例の5年生存率は65.4%と18歳以上のレシピエント1,365例の5年生存率70.3%より明らかに劣っているが、欧米の違いほどではなかった。一方、肝細胞癌315例中、HCV陽性114例(36%)の5年生存率は62.9%で肝細胞癌全体の5年生存率63.8%とはほぼ同じ成績であり、更に中澤らのHCV陽性レシピエント4年生存率68.2%でその60%がHCV陽性を考慮しても、影響は少ないと考えられた。よしんばHCVレシピエントの予後を肝細胞癌が影響を与えているとしても、我が国におけるHCV陽性レシピエントの生存率は約5年間で5%程度劣ると思われた。しかし、これは10年生存率での欧米との比較ができない現状で、明確な結論を下すことはできない。

#### b. ドナーとレシピエントの年齢

これらの原因の一つとして、ドナーの年齢の高齢化があげられている。Berenguerらの報告<sup>10)</sup>から、明らかに、ここ数年間のドナーの高齢化が示唆されている。このことはELTRの脳死肝移植やアメリカの生体肝移植からの報告でも明らかであるが、我が国の生体肝移植の経験から、必ずしも高齢のドナーの成績が悪いとはいえないようである。

欧米の脳死、もしくは生体肝移植におけるド

ナー高齢化による肝移植後の成績の悪化の一つの可能性として、通常のHCV感染で、若年者の罹患後の状況と、高齢者の罹患後の状況では、明らかに高齢者の方が線維化や肝硬変への進展は急速で、また肝細胞癌の移行も早急であるとされている。この事実を鑑みると、高齢のドナー肝臓への大量のHCV感染が、線維化の進展に大いに関連があることが推測される。

しかしながら、現時点で、この生体肝移植ドナーの高年齢との関連性は我が国における生体肝移植では当てはまらないようである。なぜならば、我が国のHCV陽性レシピエントは比較的高齢で、そのドナーは兄弟、子供などで、むしろドナーの年齢は若年者が多いものと思われる。

それよりも、レシピエントの高齢化の方がHCV陽性レシピエントの成績の悪化に関連しているように思える。事実、ELTRの脳死例、アメリカの生体肝移植例では高齢者レシピエントの成績が統計学的に有意に低下している。更に、中澤の報告でも、55歳以上のHCV陽性レシピエントと55歳以下のレシピエントの4年生存率はそれぞれ56%と81%と、統計学的に有意に高齢者の方が生存率は低下している(図4)。

したがって、必ずしもドナーの高齢化ではなく、レシピエントの高齢化も考慮しなければならないと考える。

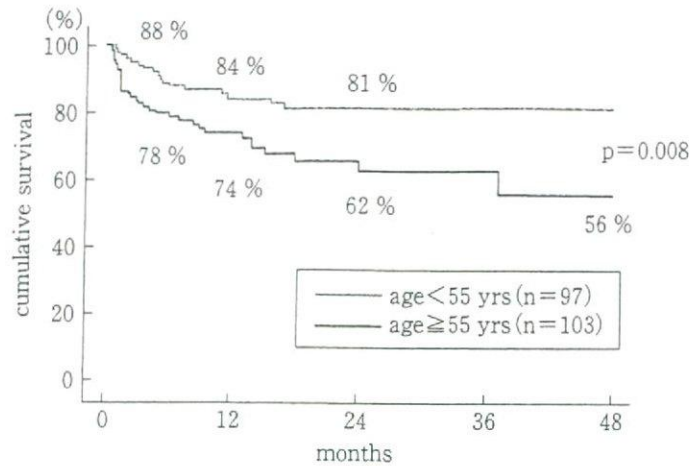


図4 年齢別レシピエント生存率 (Kaplan-Meier 法)<sup>18)</sup>

### c. 免疫抑制剤

最近では免疫抑制剤の相違により、グラフト肝でのHCVの増殖機構が異なることが示唆されている。レプリコン実験などの基礎的研究から、タクロリムスよりサイクロスポリンの方が *in vitro* の系でHCVの増殖抑制が顕著で、その抑制率はインターフェロンとほぼ同等であるとされた<sup>20)</sup>。これらを総合すると、*in vitro* ではどうも、サイクロスポリンの方がHCVの増殖抑制を導き出していると考えた方が妥当である。

問題は、臨床の場でサイクロスポリンが肝移植後、*in vitro* の結果と同じように、HCV感染に関して有効であるか否かの検証である。実際に、サイクロスポリンを肝移植後使用することで肝炎進展リスクが低くなったとの報告<sup>21)</sup>がある一方で、肝移植後の生存率やグラフト生着率に関しては賛否両論あり<sup>22,23)</sup>、その臨床的評価は一定していない。

一方、これら再発したHCV肝炎に対する治療の介入として免疫抑制剤という環境はいかなる影響を与えるのであろうか。Casanovaらはタクロリムスよりサイクロスポリン投与下の方がインターフェロンとリバビリン併用療法の奏効率が高く、脱落例も少なかったとしている<sup>24)</sup>。更に、我が国のInoueらはサイクロスポリンとインターフェロンの併用療法でSVR(sustained virological response: 持続的ウイルス陰性化)率76.3%としている<sup>25)</sup>。もちろん、この両者の投与は副作用も多く、更に我が国に多いIb、高ウ

イルス量のHCV感染レシピエントに対して、使用可能かどうか、検証することも必要となる。

### d. ステロイドパルス

肝移植後、急性拒絶反応はもとより、カルシニューリン抑制剤とともに併用する施設が多い。この副腎皮質ホルモンとHCVに関しては、幾つかの考えが報告されている。

HBVとは異なり glucocorticoid response element の存在がないことより、実験系ではこのステロイドはHCVの増殖系を明確に増殖するという証明はないが、臨床的にはHCV RNAを増加させるという報告がある<sup>26)</sup>。

そして、肝移植医療で、拒絶時に用いられるステロイドパルス療法がHCV再感染に最も関与し、これがリスクファクターであるとしている報告が幾多もある<sup>27)</sup>。

更に、ステロイドの総投与量とHCVの再発との関連性も示唆され、再発群が非再発群に比して有意にステロイドの総投与量が多いとされている<sup>28)</sup>。そのステロイドの投与期間との関連性についてはまだまだ一定の見解は得られていないが、ステロイドは少なければ少ないほどHCVの再燃を抑制するが、拒絶反応を誘発し、生存率を低下させては元も子もなくなるので、最低限度のステロイドパルスは必要である。基本的には維持投与はなくす方向が最適な環境の一つになるように思えるが、これもまだまだエビデンスを得る努力が必要となる因子である。

表1 2000年以降の post transplant treatment の成績

報告者(文献)	症例	IFN量(回数)	リバビリン	期間	ETVR	SVR	脱落/減量
Samuel <sup>33)</sup>	28	2b/3M/(3x/w)	1,000	12M	21%		16/28
Bizollon <sup>34)</sup>	54	?/3M/(3x/w)	?	6M		26%	
Shakil <sup>35)</sup>	38	?/3M/(3x/w)	800	12M		18%	16/38
Lavezzo <sup>36)</sup>	57	2b/3M/(3x/w)	800	6M	23%	17%	51%
Kornberg <sup>37)</sup>	15	2b/3M/(3x/w)	600	12M	64%	88%	2/15
Narayanan <sup>38)</sup>	26	2b/3M/(3x/w)	1,000	12M	35%	23%	13/26
Wiesner <sup>39)</sup>	9	2b/3M/(3x/w)	600	12M	11%	?	8/9
Alberti <sup>40)</sup>	18	?/3M/(3x/w)	600	12M	44%	27%	?
Ahmad <sup>41)</sup>	20	2b/3-5M/(3x/w)	600	12M	20%		5/20
De Vera <sup>42)</sup>	32	?/1.5-3M/(3x/w)	400	12M	9%		13/32
Cotler <sup>43)</sup>	12	2a/3M/(3x/w)	—	12M	50%	?	7/8

#### e. 生体ドナーと small for sized graft

生体肝移植の方がHCV感染後の病態悪化や病状の進展が顕著であると報告された<sup>29-32)</sup>。つまりHCV再感染やその時期が早まること、更には重症型肝炎が多いことが示唆された。その要因としてはIRES(internal ribosomal entry site)の活性化、再生肝細胞内でのHCVの濃縮、再生増殖肝細胞がLDLレセプターのup-regulationを介してHCVの進入を促進する、いわゆるendocytosisの活性化が関与するなどの理由が考えられている。

したがって、アメリカでは急性拒絶反応が少なく、若年者で、肝移植前の病態が比較的軽症で、アフリカ系アメリカ人ではなく、更に、肝移植前にHCVを除去あるいは軽減させるなどの条件が生体肝移植後のHCVの再感染を少なくする因子としている。一方で、生体肝移植ではHLAの合致率が高く、更に再生肝細胞というこの2点が生体肝移植後のHCV再燃に不利に働くとの認識を有しているようである。

しかしながら、必ずしも再生肝臓とHCVの増殖の関連性に関して臨床的な事実はないように思える。例えば、我が国に多いHCV陽性肝細胞癌に対する、肝切除後にHCVの急速な増殖によるFCHやウイルスのflare、あるいは重症型肝炎などは、ほとんど経験がないであろう。

更に、生体肝移植におけるsmall for sized graftの存在もHCV陽性レシピエントの成績不

良の要因と考えられた。しかし、中澤の報告では必ずしもsmall for sized graftが生存率に関与しないことが判明している<sup>18)</sup>。

したがって、現時点の我が国の成績から生体肝移植がHCV陽性レシピエントの生存率低下に関与しているとは考えられないとの結論が得られている。

#### 4. HCV再感染に対する治療(post transplant treatment)

2000年以前は、インターフェロンの単独投与が行われたが、期待された効果は得られず、むしろ拒絶反応を誘発するとして多くの施設では施行されなかった。しかし、2000年以降、HCVレシピエントの急速な病状悪化から、盛んに抗ウイルス療法の臨床試験が試みられてきた<sup>33-43)</sup>(表1)。すべて欧米の報告であるため、感染時期の相違、ウイルスのサブタイプの違い、人種間の相違など一概に我が国での慢性肝炎や肝移植後の慢性肝炎に対する治療結果と比較検討することは困難である。そこで得られつつある結論は、インターフェロン単独療法よりインターフェロンとリバビリン併用療法の方がウイルス排除やトランスアミナーゼ値の正常化率は高率である。しかし、半数以上のレシピエントで併用療法の中止か薬剤投与量の減量などで、当初の目的を達せられずに治療を断念する症例が圧倒的に多いということである。

我が国でも、Sugawara がインターフェロン治療を行い、35%弱のSVRを得られたと報告している。これらの大半は genotype I の高ウイルス量であることから、この治療効果は一定の評価は得られるが、通常の慢性肝炎に比してそのSVRは低値である<sup>44)</sup>。

今、考えられているのは、①肝移植後は3-6カ月以内にインターフェロンとリバビリン併用療法を速やかに開始する。②肝移植後、早期に低用量のインターフェロン投与を開始し、長期間投与を試みる。③可能なかぎりステロイドは離脱状況が望ましい。④そして、副作用の点からインターフェロンの投与量、投与間隔、リバビリンの投与量は適宜漸減して、少なくとも半年、可能であれば48週間継続投与が望ましい。⑤脱落例に対しては、通常の慢性肝炎治療に即してトランスアミナーゼ値を正常化させるなどの、抗炎症療法を継続せざるを得ないと思われる。適切な薬剤として強力ネオミノファーゲンシー®とUDCAあたりが妥当であろうか。その場合、線維化の進展抑制が目標となるであろうが、臨床的事実は一つもないのが現状である、などである。特に、肝移植後、いつ抗ウイルス療法を開始するかが、一つの問題点である。肝移植後のプロトコル肝生検の妥当性は別として、術後3-6カ月、1年、1.5年後に肝生検を施行して、F1/A1以上の変化がみられた段階で抗ウイルス療法(ペグインターフェロンとリバビリン)を開始するのが世界の趨勢になりつつある。

## 5. Prophylaxis

肝移植後のインターフェロンとリバビリン併用療法のコンプライアンスが極めて悪いとなると、やはり肝移植前に抗ウイルス療法を試みようとするのは自然の流れである。もちろん、肝移植の適応疾患であるから非代償性肝硬変がほとんどである。これら肝硬変に対する併用療法のコンプライアンスも肝硬変に合併する血小板減少などと合わせて困難であることも事実である。しかし、投与方法、投与量を考慮することにより、全く抗ウイルス療法を施行しない例に比して、確かにHCVの再感染が抑制される

ことも当然と考える。例えば、インターフェロン $\alpha 2-b$ を100万単位と低用量にして週に3回投与し、更に低用量のリバビリン400mgにて33%にHCV RNAの陰性化をみたとしている<sup>45)</sup>。そのほかにも二、三の臨床的試みもある<sup>46)</sup>。もちろん、肝硬変に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法でさえ標準治療よりSVR率が低値であることより<sup>47)</sup>、どこまで信頼性がおけるか問題である。

更に、HBVと同じような考えからの、多クローン性C型肝炎免疫グロブリンによるpost-transplantな免疫予防は、現時点では再感染予防には影響を及ぼさなかったとされている。

著者らは既に肝移植前に血中HCV RNAを短期間に陰性化する目的で速効性のインターフェロン $\beta$ を用い、血小板減少に備えながら約2週間投与し、血中HCV RNA(4.2 Meq/ml)の陰性化を確認してから生体肝移植を行い、術後3年間HCV RNA陰性、肝機能検査値の正常化をもたらした症例を報告している<sup>48-50)</sup>。

しかし、その後の症例ではあまりにも非代償性肝硬変であるために予定の投与が完遂できず、再感染に甘んじているのも事実である。著者は、HCV陽性の肝移植候補者のなかで、比較的肝硬変でもCTPスコアの低い症例を対象にこの術前インターフェロン $\beta$ の投与を考えている。そうすると、必然的にCTP分類Cの症例は外され、むしろ代償性肝硬変もしくは慢性肝炎を背景に有する再発を繰り返す肝細胞癌が最も適した術前治療群になるものと想定している。

## おわりに

肝移植医療は医学的エビデンスがない状況で発展したという経緯がある。しかし、少なくともこのHCV感染と肝移植に関しては臨床的エビデンスを得ながら、慎重にその疑問を解いていきたいと考える<sup>51-53)</sup>。現時点ではHCVの肝移植後の再感染機構の解明が十分になされていないことよりHCVの再感染は移植成績に重大な影響を及ぼすと思われるので、その適応、実践に関しては慎重でなければならないものと考え

## 圖文 献

- 1) Ferray C, et al: The course of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 20 : 1137-1143, 1994.
- 2) Gane EJ, et al: Long-term outcome of hepatitis C infection after liver transplantation. *N Engl J Med* 334: 815-820, 1996.
- 3) Boker KH, et al: Long-term outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology* 25: 203-210, 1997.
- 4) Sanchez-Fueyo A, et al: Impact of the recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation on the long-term viability of the graft. *Transplantation* 73: 56-63, 2002.
- 5) Forman LM, et al: The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 122: 889-896, 2002.
- 6) Ichida T, et al: Living related donor liver transplantation from adult to adult for primary biliary cirrhosis. *Ann Intern Med* 122: 275-276, 1995.
- 7) Garcia-Retortillo M, et al: Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 35: 680-687, 2002.
- 8) Sreekumar R, et al: Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology* 32: 1125-1130, 2000.
- 9) Saxena R, et al: Utilization of acidophil bodies in the diagnosis of recurrent hepatitis C infection after orthotopic liver transplantation. *Mod Pathol* 15: 897-903, 2002.
- 10) Berenguer M, et al: Contribution of donor age to the recent decrease in patient survival among HCV-infected liver transplant recipients. *Hepatology* 36: 202-210, 2002.
- 11) Ferray C, et al: European collaborative study on factors influencing the outcome after liver transplantation for hepatitis C. *Gastroenterology* 117: 619-625, 1999.
- 12) Samuel D, Ferray C: Recurrent hepatitis C after liver transplantation: clinical and therapeutical issues. *J Viral Hepat* 7: 87-92, 2000.
- 13) 市田隆文: 肝移植時のB型肝炎ウイルスとC型肝炎ウイルス再感染の予防と治療. *肝胆膵* 47: 715-724, 2003.
- 14) 市田隆文: 肝移植後における原疾患の再発とその対応. *肝臓* 42: 63-75, 2001.
- 15) Rosen HR: Retransplantation for hepatitis C: implications of different policies. *Liver Transpl* 6: S41-46, 2000.
- 16) Brillanti S, et al: Slowly tapering off steroids protects the graft against hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 8: 884-888, 2002.
- 17) Wali M, et al: Advancing donor liver age and rapid fibrosis progression following transplantation for hepatitis C. *Gut* 51: 248-252, 2002.
- 18) 中澤勇一: 厚生労働省班会議門田班. 報告 2005年4月.
- 19) 日本肝移植研究会: 肝移植症例登録報告. *移植* 39: 634-642, 2004.
- 20) Watashi K, et al: Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 38: 1282-1288, 2003.
- 21) Berenguer M, et al: A model to predict severe HCV-related disease following liver transplantation. *Hepatology* 38: 34-41, 2003.
- 22) Wiesner RH: A long-term comparison of tacrolimus(FK506) versus cyclosporine in liver transplantation: a report of the United States FK506 Study Group. *Transplantation* 66: 493-499, 1998.
- 23) Villamil F: Abstract Liver Transpl 9(6): C-79 # 314, 2003.
- 24) Casanova C, et al: *Gastroenterol* 25(4): 280-288, 2002.
- 25) Inoue K, et al: Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial. *J Gastroenterol* 38: 567-572, 2003.
- 26) McHutchison JG, et al: Prednisone withdrawal followed by interferon alpha for treatment of chronic hepatitis C infection: results of a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 32: 133-137,

- 2001.
- 27) Sheiner PA, et al: Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 21: 30-34, 1995.
  - 28) Testa G, et al: Liver transplantation for hepatitis C: recurrence and disease progression in 300 patients. *Liver Transpl* 6: 553-561, 2000.
  - 29) Everson GT, Trotter J: Role of adult living donor liver transplantation in patients with hepatitis C. *Liver Transpl* 9: S64-S68, 2003.
  - 30) Gaglio PJ, et al: Increased risk of cholestatic hepatitis C in recipients of grafts from living versus cadaveric liver donors. *Liver Transpl* 9: 1028-1035, 2003.
  - 31) Ghobrial RM, et al: Donor and recipient outcomes in right lobe adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 8: 901-909, 2002.
  - 32) Trotter JF, et al: Living donor liver transplant recipients achieve relatively higher immunosuppressant blood levels than cadaveric recipients. *Liver Transpl* 8: 212-218, 2002.
  - 33) Samuel D, et al: Interferon- $\alpha$  2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C after liver transplantation: a randomized study. *Gastroenterology* 124: 642-650, 2003.
  - 34) Bizollon T, et al: Long term histological improvement and clearance of intrahepatic hepatitis C virus RNA following sustained response to interferon-ribavirin combination therapy in liver transplanted patients with hepatitis C virus recurrence. *Gut* 52: 283-287, 2003.
  - 35) Shakil AO, et al: A pilot study of interferon alfa and ribavirin combination in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C. *Hepatology* 36: 1253-1258, 2002.
  - 36) Lavezzo B, et al: Treatment of recurrent hepatitis C in liver transplants: efficacy of a six versus a twelve month course of interferon alfa 2b with ribavirin. *J Hepatol* 37: 247-252, 2002.
  - 37) Kornberg A, et al: Long-term combination of interferon alfa-2b and ribavirin for hepatitis C recurrence in liver transplant patients. *Am J Transplant* 1: 350-355, 2001.
  - 38) Narayanan Menon KV, et al: Treatment of posttransplantation recurrence of hepatitis C with interferon and ribavirin: lessons on tolerability and efficacy. *Liver Transpl* 8: 623-629, 2002.
  - 39) Wiesner RH, et al: Interferon- $\alpha$  plus ribavirin and amantadine in patients with post-transplant hepatitis C: results of a pilot study. *Dig Liver Dis* 33: 693-697, 2001.
  - 40) Alberti AB, et al: Combined therapy with interferon and low-dose ribavirin in posttransplantation recurrent hepatitis C: a pragmatic study. *Liver Transpl* 7: 870-876, 2001.
  - 41) Ahmad J, et al: Recurrent hepatitis C after liver transplantation: a nonrandomized trial of interferon alfa alone versus interferon alfa and ribavirin. *Liver Transpl* 7: 863-869, 2001.
  - 42) De Vera ME, et al: Interferon- $\alpha$  and ribavirin for the treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transplantation* 71: 678-686, 2001.
  - 43) Cotler SJ, et al: Daily interferon therapy for hepatitis C virus infection in liver transplant recipients. *Transplantation* 71: 261-266, 2001.
  - 44) Sugawara Y, et al: Preemptive therapy for hepatitis C virus after living-donor liver transplantation. *Transplantation* 78: 1308-1311, 2004.
  - 45) Crippin JS, et al: A pilot study of the tolerability and efficacy of antiviral therapy in hepatitis C virus-infected patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl* 8: 350-355, 2002.
  - 46) Mazzafero V, et al: Prophylaxis against HCV recurrence after liver transplantation. Effect of interferon and ribavirin combination. *Transplant Proc* 29: 519-521, 1997.
  - 47) Wright TL: Treatment of patients with hepatitis C and cirrhosis. *Hepatology* 36: S185-194, 2002.
  - 48) Sato Y, et al: Preoperative administration of 5-FU and IFN beta may prevent recurrence of hepatitis B and C virus. *Am J Gastroenterol* 97: 215-216, 2002.
  - 49) 山本 智ほか: 再発を繰り返すC型肝炎細胞がんに対する生体肝移植の一例, 第21回犬山シンポジウム 高度進行肝細胞癌, 生体部分肝移植, B型, C型慢性肝炎治療(犬山シンポジウム記録刊行会編), p118-125, 中外医学社, 2000.
  - 50) Ichida T, Satoh Y: Prophylaxis and posttransplant treatment of viral hepatitis in living donor liver



transplantation. In: Current Issues in Liver and Small Bowel Transplantation, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Volume 9(ed by Kitajima M, et al), p 62-71, Springer-Verlag, 2002.

- 51) 市田隆文ほか：HCV再感染は肝移植の予後を左右するか. 肝胆膵 50(1):129-140, 2005.
- 52) 市田隆文ほか：肝移植後のHCV再感染—現状と対策—. 肝臓 46(6):344-351, 2005.
- 53) 市田隆文ほか：肝炎ウイルスと臓器移植. 今日の移植 18(3):267-276, 2005.

## C型肝炎ウイルス陽性レシipientに対する ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の成績

森 広 樹\* 阿 部 哲 史\* 石 川 雅 邦\*  
小 川 薫\* 市 田 隆 文\*

索引用語：C型肝炎ウイルス，肝移植，ペグインターフェロン，リバビリン

### 1 はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)陽性レシipientの肝移植後の病態が、1995年頃から以前とは異なり肝移植後、比較的早期に肝硬変に進展し、治療に抵抗性でかつ短期間で非代償性肝硬変となり、その長期予後に深刻な影響を与えることが判明してきた。すなわち、HCV陽性レシipientは非HCVレシipientに比して、明らかに生存率が低下することがスペインのグループから報告され<sup>1-3)</sup>、その主な要因にドナーの高齢化、免疫抑制剤の種類による抗ウイルス効果、副腎皮質ホルモンの過剰投与、生体肝移植による肝細胞の再生とウイルスの増殖、胆管トラブルによる線維化の後押しなどが挙げられてきた。しかし、そのほかにHCVそのものによる変化や、肝移植後の各種薬剤負荷状態、免疫抑制に関連リンパ球の反応など多くの関係因子が示唆されているが、明確な要因はいまだ不明のま

までである<sup>4-9)</sup>。

本稿では、肝移植後のC型肝炎ウイルスの再感染を認め、肝炎発症例に対する治療、いわゆる post transplant treatmentとしてのペグ化インターフェロンとリバビリンの併用療法が、いかなる成績を示し、肝移植医療にどの程度貢献しているかを検証することを目的に欧米の成績をまとめ、筆者らの意見を述べることにする。

### 2 従来の治療の成績

この肝移植後の抗ウイルス療法として、ウイルス排除が第一の目的である。しかし、一般に考えられている Biochemical Responderが肝移植後の臨床に意味があるのか否か、難しいところである。すなわち、壊死、炎症反応を抑制する抗炎症療法に臨床的意義がもたされるのか。そして、一般的な慢性肝炎にとられるような肝細胞癌抑止を目標にすべき対象なのかも明確ではない。現時点では、ウイル

Hiroki Mori et al : Clinical outcome of peginterferon and ribavirin for hepatitis C positive transplant recipients

\*順天堂大学医学部附属静岡病院消化器内科 [〒 410-2295 伊豆の国市長岡 1129]

表1 2000年以降の post transplant treatment の成績

報告者(文献)	症例	IFN量(回数)	リバビリン	期間	ETVR	SVR	脱落/減量
Samuel (10)	28	2b/3M/ (3x/w)	1,000	12M	21%		16/28
Bizollon (11)	54	?/3M/ (3x/w)	?	6M		26%	
Shakil (12)	38	?/3M (3x/w)	800	12M		18%	16/38
Lavezzo (13)	57	2b/3M/ (3x/w)	800	6M	23%	17%	51%
Kornberg (14)	15	2b/3M/ (3x/w)	600	12M	64%	88%	2/15
Narayanan (15)	26	2b/3M/ (3x/w)	1,000	12M	35%	23%	13/26
Wiesner (16)	9	2b/3M (3x/w)	600	12M	11%	?	8/9
Alberti (17)	18	?3M (3x/w)	600	12M	44%	27%	?
Ahmad (18)	20	2b/3-5 (3x/w)	600	12M	20%		5/20
De Vera (19)	32	?/1.5-3M (3x/w)	400	12M	9%		13/32
Coltler (20)	12	2a/3M (3x/w)	-	12M	50%	?	7/8

ス排除に固執した方が<sup>5</sup>, 臨床的意義が深いと考える。なぜならば, 免疫抑制剤, さらには肝細胞の再生という基盤での抗炎症作用が, はたして抗線維化に繋がるか, 甚だ疑問点が多いからである。

2000年前は, インターフェロンの単独投与が行われたが, 期待された効果は得られず, むしろ拒絶反応を誘発するとして多くの施設では施行されなかった。しかし, 2000年以降, HCVレシピエントの急速な病状悪化から, 盛んに抗ウイルス療法の臨床試験が試みられてきた(表1)<sup>10-20)</sup>。すべて欧米の報告であるため, 感染時期の相違, ウイルスのサブタイプの違い, 人種間の相違など一概に本邦での慢性肝炎や肝移植後の慢性肝炎に対する治療結果と比較検討することは困難である。そこで得られつつ結論は, インターフェロン単独療法よりインターフェロンとリバビリン併用療法の方がウイルス排除やトランスアミナーゼ値の正常化率は高率である。しかし, 半数以上のレシピエントで併用療法の中止か薬剤投与量の減量などで, 当初の目的を達せられずに治療を断念する症例が圧倒的に多いということである。

欧米のインターフェロンとリバビリン併用

療法の成績をまとめると, 年齢, 人種その他の条件を無視して, 報告例を総数として計算すると307例にインターフェロンとリバビリン併用療法が使用され, その治療効果としてSVR率は208例中55例(26%)であった。最も問題となる中止率や脱落率, 減量率を大まかに計算すると233例中109例(47%)に認められている。

これらは移植後, 肝炎の再燃を観察した後, post transplant treatmentとして治療が開始されているが, 肝炎の発症のいかんに関わらず, 移植後早期にインターフェロン治療を行う preemptive treatmentも数施設で行われ, わが国のSugawaraは移植後早期にインターフェロン治療を行い, 39%のSVRを得られたと報告している。これらの大半はGenotype Iの高ウイルス量であることから, この治療効果は注目し得る<sup>21)</sup>。

### 3 ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の成績

2003年のSamuel<sup>22)</sup>から始まったペグインターフェロンとリバビリン併用療法は, 集計するとおおよそ179例に投与されている(表2)<sup>22-29)</sup>。それぞれの条件や人種が異なる

が、これらをまとめてみると、HCV陽性レシピエントに肝移植後、3～96カ月の間にペグインターフェロンとリバビリンが投与開始されている。男性128例、女性51例で平均年齢54.4歳であった。今まで報告されているペグインターフェロンはすべてa 2bで1.0～1.5  $\mu$ g/kg/週で、リバビリンは400～1,000 mgであった。投与期間はI型とIV型は48週間、II型とIII型は24週間投与であった(表2)。

成績全体をまとめると、SVRは179例中46例(26%)であり、いわゆるBiochemical Responderは129例中58例(45%)であった。投与中止例は148例中48例(32%)にみられ、インターフェロンもしくはリバビリンの減量例は75例中46例(61%)に及んでいた。

以前から、言及されていたインターフェロンによる拒絶反応の誘発は記載のある報告だけで見ると75例中16例(13%)に認めたとされている(表3)。

以前のインターフェロンの週3回投与とリバビリン併用療法と比較してみると、なんと大雑把な計算であるが、ペグインターフェロンを用いた最新の報告とペグ化していないインターフェロンとリバビリン併用療法でそのSVR率は26%と全く変わりはなかったことが判明した。さらに、驚いたことに中止率や脱落率もほとんど変わりのないことが明らかになった。すなわち、インターフェロンでもペグインターフェロン投与でも、リバビリン併用療法による成績は全く変わりのないことが分かった。

従来のインターフェロンよりもペグインターフェロンの方が、血中濃度、AUCさらにはコンプライアンスから通常の慢性肝炎に対してはより普遍化されているが、肝移植医療の領域では必ずしもそうではないようであ

る。すなわち、副作用の発現が認められた際の対処に困難を要する可能性を示すからである。従来型インターフェロンで副作用が出現しても、血中濃度から考慮すると、即座に投与中止で、その濃度は下降し、副作用は改善するだろう。しかし、ペグインターフェロンの場合、その効果を血中濃度を考慮するならば、副作用の継続が、例え投与中止しても改善されない可能性がある。もちろん、中和抗体がない現状では、危険があるといわざるを得ない。したがって、肝移植後のインターフェロン投与に関しては、通常インターフェロンで導入するのが副作用の面からも推奨されるかもしれないが、全くエビデンスのない話で、これらは今後の症例数の増加から結論が得られるのかもしれない。

## 4 結 論

従来のインターフェロンからペグインターフェロンを新たに用いたリバビリンとの併用療法がさらなる効果と、脱落例や中止例を減少させたか否かが今回の検証時のポイントであった。結論からいうと、ペグインターフェロンを用いても期待される以上の効果と副作用、脱落例と中止例の減少を得ることは困難なようである。通常型のインターフェロンとペグインターフェロンではリバビリン併用療法では全く効果に差異がないことが今のところ判明している。

むしろ、拒絶反応を少し誘発している可能性もある。これら検索には免疫抑制剤の種類による検討はなされていないが、例えばサイクロスポリンにHCVに対する抗ウイルス作用を考慮するならばこの抗ウイルス療法での免疫抑制剤の種類も今後考えなければならぬということかもしれない。

表2 ベグインターフェロンとリバビリン併用療法の背景

報告者(文献)	報告年	症例数	年齢性別	移植後投与開始時期	PEGの種類	PEGの量	RIBの量	投与期間
Didier Samuel (22)	2003	22 (1型17)	58歳男13女9	95.5月	a 2b	1.0 μg/kg/週	7.5mg/kg/日	48 (1型)または24 (1型以外)週
S.Mukherjee (23)	2003	39 (1型31,2型2,3型3,4型3)	50.4歳 (19-75)男33女6	22月(2-166)	a 2b	1.5 μg/kg/週	800mg/日	48 (1,4型)または24 (2,3型)週
Hector Rodriguez-Luna (24)	2004	19 (1型12,2型3,3型3,4型1)	53歳男14女5	32月	a 2b	0.5 μg/kg/週最大1.5 μg/kg	400 → 1,000mg/日	48週
Jerome Dumortier (25)	2004	20 (1型16,2型1,3型2,4型1)	53.8歳男13女7	28月	a 2b	0.5 to 1.0 μg/kg/週	400 - 1,200mg/日	48週
M Babatin (26)	2005	13 (1a2,1b6,2型2,3型1,4型1,6型1)	49.4歳 (44.3-55.5)男10女3	26.4月	a 2b	平均0.91 μg/kg/週(0.5-1.1)	平均662mg/日(0-1200)	48週, 34.5 (2,4-93)
J.M. Moreno Planas (27)	2005	30 (1a3,1b24,3型3)	56歳 (40-68)男22女8	52月	a 2b	1.5 μg/kg/週	10.6mg/kg/日	48 (1,4型)またはor24 (2,3型)週
Pierluigi Toniutto (28)	2005	12 (1b)	56.5歳 (23-63)男6女6		a 2b	0.5 μg/kg/週	600-800mg/日	48週
Luis Castells (29)	2005	24 (1b24)	61.4歳男17女7	3.8月	a 2b	1.5 μg/kg/週	600 → 800mg/日	48週
総計		179例	54.4歳男128例女51例		a 2b	1.0-1.5 μg/kg/週	400mg-1000mg	すべて48週

表3 ベグインターフェロンとリバビリン併用療法の成績

報告者(文献)	報告年	SVR率	BR率	NC率	中止率	減量率	拒絶反応
Didier Samuel (22)	2003	4/22 (18%)	11/22 (50%)		14/22 (64%)		
S.Mukherjee (23)	2003	12/39 (31%)	12/39 (31%)	8/39 (21%)	17/39 (44%)		0
Hector Rodriguez-Luna (24)	2004	5/19 (26%)			7/12 (58%)		1/19 ( 5%)
Jerome Dumortier (25)	2004	9/20 (45%)	15/20 (75%)		4/20 (20%)	6 (IFN) 13 (RIB)/20 (95%)	5/20 (25%)
M Babatin (26)	2005	4/13 (31%)	9/13 (69%)		4/13 (31%)	6 (ribavirin)/13 (47%)	3/13 (23%)
J.M. Moreno Planas (27)	2005	14/30 (47%)			11/30 (37%)		0
Pierluigi Toniutto (28)	2005	1/12 ( 8%)	3/12 (25%)		7/12 (58%)		0
Luis Castells (29)	2005	8/23 (35%)	8/23 (35%)				1/23 ( 4%)
総計(平均)		46/178 (26%)	58/129 (45%)	8/39 (21%)	48/148 (32%)	46/75 (61%)	10/75 (13%)

## 5 今後の課題

予後が不良とされてきたHCV陽性レシピエントに対して、今、考えられているのは、以下の点である。①肝移植後は3～6カ月以内にインターフェロンとリバビリン併用療法を速やかに開始することである。②可能な限りステロイドは離脱状況が望ましい。③そして、副作用の点からインターフェロン用量、投与間隔、リバビリン用量は適宜漸減して、少なくとも半年、可能であれば48週間継続投与が望ましい。④脱落例に対しては、通常の慢性肝炎治療に即してトランスアミナーゼ値を正常化させる目的の抗炎症療法の継続を選択せざるを得ないと思われる。適切な薬剤として強力ネオミノファーゲンCとUDCA辺りが妥当であろうか。その場合、線維化の進展抑制が目標となるであろうが、臨床的事実は一つもないのが現状である。

特に、肝移植後、いつ抗ウイルス療法を開始するかが、一つの問題点である。肝移植後のプロトコル肝生検の妥当性は別として、術後3～6カ月、1年、1.5年後に肝生検を施行して、F1/A1以上の変化がみられた段階で抗ウイルス療法(ペグインターフェロンとリバビリン)を開始するのが世界の趨勢になりつつあるようであるが、preemptive treatmentの成績も良好なので、今後の症例の積み重ねが必要となってくるであろう。

### 文 献

- 1) Sanchez-Fueyo A, Restrepo JC, Quinto L et al : Impact of the recurrence of hepatitis C virus infection after liver transplantation on the long-term viability of the graft *Transplantation* 73 : 56-63, 2002
- 2) Forman LM, Lewis JD, Berlin JA et al : The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation *Gastroenterology* 122 : 889-896, 2002
- 3) Bizollon T, Mutimer D, Ducerf C et al : Hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Gut* 44 : 575-578, 1999
- 4) 市田隆文, 森 広樹, 阿部哲史, 他 : C型肝炎に対する肝移植医療—その再発肝炎対策. *日本臨床*63 (11) : 2012-2021, 2005
- 5) 市田隆文 : Editorial : C型肝炎の再感染とその対策. *肝臓*46 (9) : 529-533, 2005
- 6) 市田隆文, 嶋田裕慈, 森 広樹, 他 : 肝移植後のHCV再感染—現状と対策—. *肝臓*46 (6) : 344-351, 2005
- 7) 市田隆文, 嶋田裕慈, 森 広樹 : 肝炎ウイルスと臓器移植. *今日の移植*18 (3) : 267-276, 2005
- 8) 市田隆文, 嶋田裕慈, 森 広樹, 他 : HCV再感染は肝移植の予後を左右するか. *肝胆膵* 50 (1) : 129-140, 2005
- 9) 市田隆文 : 肝移植時のB型肝炎ウイルスとC型肝炎ウイルス再感染の予防と治療. *肝胆膵* 47 (5) : 715-724, 2003
- 10) Samuel D, Bizollon T, Feray C et al : Interferon-alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C after liver transplantation: a randomized study. *Gastroenterology* 124 : 642-650, 2003
- 11) Bizollon T, Ahmed SN, Radenne S et al : Long term histological improvement and clearance of intrahepatic hepatitis C virus RNA following sustained response to interferon-ribavirin combination therapy in liver transplanted patients with hepatitis C virus recurrence. *Gut* 52 : 283-287, 2003
- 12) Shakil AO, McGuire B, Crippin J et al : A pilot study of interferon alfa and ribavirin combination in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C. *Hepatology* 36 : 1253-1258, 2002
- 13) Lavezzo B, Franchello A, Smedile A et al : Treatment of recurrent hepatitis C in liver transplants: efficacy of a six versus a twelve month course of interferon alfa 2b with ribavirin. *J Hepatol* 37 : 247-252, 2002
- 14) Kornberg A, Hommann M, Tannapfel A et al : Long-term combination of interferon alfa-2b and ribavirin for hepatitis C recurrence in liver transplant patients. *Am J Transplant* 1 : 350-355, 2001
- 15) Narayanan Menon KV, Poterucha JJ et al : Treatment of posttransplantation recurrence of hepatitis C with interferon and ribavirin: lessons on tolerability and efficacy *Liver Transpl* 8 : 623-629,

- 16) Wiesner RH, Charlton M, Andreone P et al : Interferon-alpha plus ribavirin and amantadine in patients with post-transplant hepatitis C: results of a pilot study. *Dig Liver Dis* 33 : 693-697, 2001
- 17) Alberti AB, Belli LS, Airoidi A et al : Combined therapy with interferon and low-dose ribavirin in posttransplantation recurrent hepatitis C: a pragmatic study. *Liver Transpl* 7 : 870-876, 2001
- 18) Ahmad J, Dodson SF, Demetris AJ et al : Recurrent hepatitis C after liver transplantation: a non-randomized trial of interferon alfa alone versus interferon alfa and ribavirin. *Liver Transpl* 7 : 863-869, 2001
- 19) De Vera ME, Smallwood GA, Rosado K et al : Interferon-alpha and ribavirin for the treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transplantation* 71 : 678-686, 2001
- 20) Cotler SJ, Ganger DR, Kaur S et al : Daily interferon therapy for hepatitis C virus infection in liver transplant recipients. *Transplantation* 71 : 261-266, 2001
- 21) Sugawara Y, Makuuchi M, Matsui Y et al : Pre-emptive therapy for hepatitis C virus after living-donor liver transplantation. *Transplantation* 78 : 1308-1311, 2004
- 22) Samuel D, Brousse P : Treatment of patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation with pegylated interferon and ribavirin. *Hepatology* 34 : 531A, 2003
- 23) Mukherjee S, Rogge J, Weaver L et al : Pilot study of pegylated interferon  $\alpha$ -2b and ribavirin for recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transplant Proc* 35 : 3042-3044, 2003
- 24) Rodriguez-Luna H, Khatib A, Sharma P et al : Treatment of recurrent hepatitis C infection after liver transplantation with combination of pegylated interferon  $\alpha$  2b and ribavirin: an open-label series. *Transplantation* 77: 190-194, 2004
- 25) Dumortier J, Scoazec JY, Chevallier P et al : Treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation: a pilot study of peginterferon alpha-2b and ribavirin combination. *J Hepatol* 40 : 669-674, 2004
- 26) Babatin M, Schindel L, Burak KW : Pegylated-interferon alpha 2b and ribavirin for recurrent hepatitis C after liver transplantation: From a Canadian experience to recommendations for therapy. *Can J Gastroenterol* 19 : 359-365, 2005
- 27) Moreno Planas JM, Rubio Gonzalez E, Boullosa Grana E et al : Peginterferon and ribavirin in patients with HCV cirrhosis after liver transplantation. *Transplant Proc* 37 : 2207-2208, 2005
- 28) Toniutto P, Fabris C, Fumo E et al : Pegylated versus standard interferon- $\alpha$  in antiviral regimens for post-transplant recurrent hepatitis C: Comparison of tolerability and efficacy. *J Gastroenterol Hepatol* 20 : 577-582, 2005
- 29) Castells L, Vargas V, Allende H et al : Combination treatment with pegylated interferon ( $\alpha$ -2b) and ribavirin in the acute phase of hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *J Hepatol* 43 : 53-59, 2005

\*

\*

\*

# The Efficacy and Safety of Gene Transfer into the Porcine Liver In Vivo by HVJ (Sendai Virus) Liposome

Yujo Kawashita,<sup>1</sup> Hikaru Fujioka,<sup>1</sup> Akira Ohtsuru,<sup>2</sup> Yasufumi Kaneda,<sup>3</sup> Yukio Kamohara,<sup>1</sup> Yasushi Kawazoe,<sup>1</sup> Shunichi Yamashita,<sup>2</sup> and Takashi Kanematsu<sup>1</sup>

**Background.** Gene transfer systems using viral vectors are efficient; however, most viral vectors also tend to evoke immunologic reactions, thereby clinically causing serious side effects. HVJ-liposome vector is a hybrid vector consisting of liposome and an inactivated Sendai virus (Hemmagglutinating Virus of Japan [HVJ]), which has been reported to be less immunogenic and can also be repeatedly administered. We examined the usefulness of this vector for hepatic gene therapy in a pig model.

**Methods.** Genes encoding  $\beta$ -galactosidase and luciferase were used as reporter genes. The pigs were injected with the reporter gene loaded-HVJ-liposome into the portal vein under total vascular exclusion of the liver. The transfection efficiencies were then assessed by  $\beta$ -galactosidase staining, a luciferase assay, and RT-PCR for LacZ mRNA. Biochemical and histologic analyses were performed to evaluate tissue toxicity after gene transfer.

**Results.** The luciferase gene expression in the liver reached its highest level at 7 days after transfection. It continued to be detected up to 28 days after transfection, while all pigs remained healthy throughout the observation period. The transfection efficiency was 15% in the hepatocytes according to  $\beta$ -galactosidase staining. Extrahepatic transgene expression was slightly observed in the lung and kidney, but not in the spleen or ovary.

**Conclusions.** These data suggest for the first time that the use of the HVJ-liposome vector is a safe and feasible modality for liver-directed gene transfer in pigs, and it might therefore be suitable for clinical gene therapy trials.

**Keywords:** Gene transfer, Porcine liver, HVJ liposome.

(*Transplantation* 2005;80: 1623–1629)

Orthotopic liver transplantation has been clinically recognized to be the most effective strategy to treat end-stage liver disorders. However, the high invasiveness of this modality and the shortage of donor organs for transplantation remain crucial issues worldwide, which have thus led to increased interest in xenotransplantation, cell transplantation using stem cells or matured hepatocytes, or liver directed gene therapy (1–5). Gene transfer techniques have considerable therapeutic potential and are considered to be possibly effective approaches for the treatment of various liver diseases (6, 7). In particular, hepatic gene transfer studies provide valuable information regarding the treatment of numerous diseases including inherited liver enzyme deficiency, liver xenotransplantation, hematological disorders such as Factor IX deficiencies, and so forth (8–13).

Among the several methods of gene transfer currently in use, adenovirus seems to be one of the most efficient vehicles for hepatic gene transfer (14, 15). However, the adenovirus vector may cause liver injury or systemic inflammatory

reaction due to its highly immunologic properties (16). In fact, one fatal case has been reported in clinical gene therapy trials after adenoviral gene transfer (17). The genetic modification of conventional adenovirus may therefore be able to reduce its immunogenicity (18, 19).

A unique method of gene transfer using the hemagglutinating virus of Japan (HVJ; Sendai virus) has recently been developed, which involves the entrapment of DNA and non-histone chromosomal protein within the liposomes and the use of the ultraviolet (UV)-inactivated Sendai virus to enhance the fusion of liposome to the cellular membrane (20). Efficient hepatic gene transfer can thus be achieved using this artificial liposome (21, 22).

There are several potential advantages regarding HVJ-liposome vector as a nonviral delivery system. Firstly, the mechanism of transferring DNA does not simply depend on the replication of a competent virus, since the main component of the carrier is liposome. Secondly, the DNA transfected by HVJ-liposome does not integrate into chromosomes or propagate in animal cells, thus minimizing concerns related to public health and vector safety. A major issue that needs to be addressed before clinical trials can be performed is whether exposure of the liver with such vectors may be associated with any clinically significant adverse effects. Furthermore, information obtained from experiments on small rodents needs to be validated in larger animal models before being applied to clinical human studies. Among the livers in large mammals, the pigs appear to be one of the most suitable animals for preclinical studies, because pig livers are similar in size and physiology to the human liver, and they are also ethically suitable since pigs can be propagated easily (23, 24). In addition, pigs have also been considered to be a possible donor for xenotransplantation. The aim of the present study is, therefore, to evaluate the efficacy and safety of gene trans-

<sup>1</sup> Department of Transplantation and Digestive Surgery, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan.

<sup>2</sup> Department of International Health and Radiation Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki, Japan.

<sup>3</sup> Division of Gene Therapy Science, Osaka University, School of Medicine, Osaka, Japan.

\*Address correspondence to: Yujo Kawashita, M.D., Ph.D., Department of Transplantation and Digestive Surgery, Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan.

E-mail: yujo-ngs@umin.ac.jp

Received 22 February 2005. Revision requested 28 March 2005.

Accepted 31 July 2005.

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/05/8011-1623

DOI: 10.1097/01.tp.0000184447.88283.f3



fer into the liver in vivo using the HVJ-liposome method in a pig model.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Juvenile white, female pigs weighing 8–10 kg were used in the present experiments. All animals were maintained in a pathogen-free environment at a temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and a humidity of from 40 to 70% while chow and autoclaved water were available ad libitum. All studies were performed with the approval of the Nagasaki University Institutional Animal Care and Use Committee.

### Construction of Plasmid Vector

The expression vector used in the study was pSV- $\beta$ -galactosidase vector ( $\beta$ -gal) (Promega, Madison, WI, USA), in which the bacterial LacZ gene was driven by the simian virus 40 (SV40)-early promoter/enhancer and PGL2-control vector (Promega), in which the firefly luciferase gene was driven by the SV40-early promoter/enhancer. The above plasmids were amplified in *E. coli* and purified using alkaline lysis kits (QIAGEN Inc., Santa Clara, CA).

### Preparation of HVJ-Liposome

HVJ-liposome was prepared as described previously (20, 25). Briefly, phosphatidylserine (Avanti polar), phosphatidylcholine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and cholesterol (Sigma) were mixed at a weight ratio of 1:4.8:2. The lipid mixture (10 mg) was dried by the removal of chloroform, and then hydrated in 200  $\mu\text{l}$  of balanced salt solution (BSS; 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 13 mM Tris-HCl, pH 7.6) containing DNA-high mobility group I (HMG-I) complex (200  $\mu\text{g}$ :64  $\mu\text{g}$ ), which had been previously incubated at  $20^\circ\text{C}$  for 1 h. The mixture was intensely agitated by vortexing for 30 sec and then left to stand for 30 sec. This procedure was repeated eight times to produce multilamellar liposomes. These liposomes were then ultrasonicated to produce unilamellar liposomes. Purified HVJ was inactivated by ultraviolet irradiation (1980  $\text{J}/\text{m}^2$ ) and 15,000 hemagglutinating units (HAU) HVJ mixed with the DNA-HMG-1-liposome suspension. The mixture was incubated at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min and then for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  with shaking at 120/min. Free HVJ was removed from the crude HVJ-liposome solution by sucrose density gradient centrifugation. The second layer of sucrose containing the HVJ-liposome was collected.

### Isolation of Primary Porcine Hepatocytes from the Pig

To examine whether the HVJ-liposome or liposome itself has potential to transfer genes to porcine hepatocytes, we performed a transfection experiment in vitro. As target cells, primary hepatocytes were harvested by two-step collagenase perfusion of 10–15 kg female pig livers as described (26). The cell suspension was centrifuged three times at  $4^\circ\text{C}$  ( $50 \times g$  for 2 min) to purify the parenchymal hepatocytes. Isolated hepatocytes were dispersed into ice-cold DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO BRL, Grand Island, NY) containing 10% fetal bovine serum (FBS).

### In Vitro Transfection into Primary Hepatocytes

Freshly isolated hepatocytes, which had been cultured overnight, were incubated with growth media with liposome alone or HVJ-liposome complex containing 2  $\mu\text{g}$  of reporter plasmid DNA for 4 hr.

Thereafter the media was exchanged with normal growth media until harvest on the second day from transfection.

### Surgical Procedure for In Vivo Gene Transfer

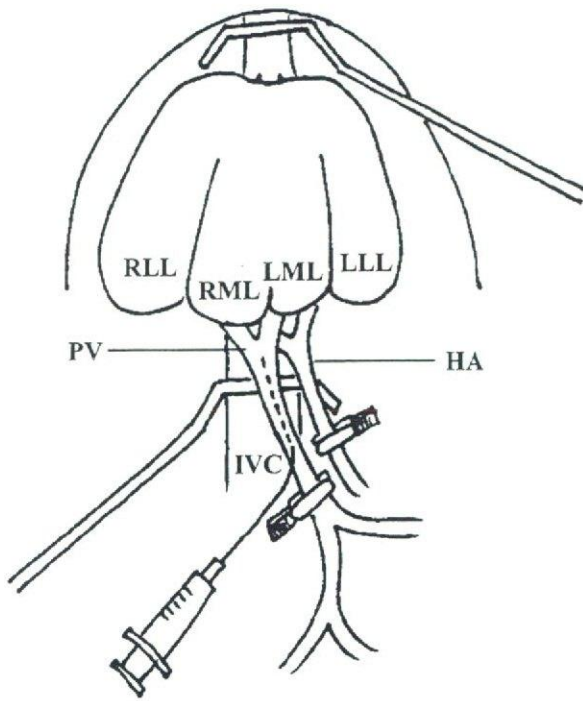
To enhance gene transfection efficiency by the vectors, the vascular clamping technique has been reported to be one important approach, in which the vectors could contact with the target cells for prolonged periods of time (27, 28). We confirmed the efficacy of the total liver exclusion technique to increase the retention time of vectors in the liver. Under general anesthesia, a midline incision was made, and then the liver was isolated from the surrounding tissues. Thereafter, a small branch of the portal vein was cannulated. Immediately after that, 100 ml of normal saline was infused to wash out any pooling blood from the liver parenchyma, followed by HVJ-liposome injection at a volume of 50 ml containing 800–1200  $\mu\text{g}$  of DNA through the inserted catheter ( $n=7$ ), under total vascular exclusion (TVE) of the liver, which included clampings of the supra- and infrahepatic vena cava (SHVC and IHVC) for 15 min as shown in Figure 1. Three of these seven transfected animals received second injections of the luciferase genes under TVE. Control pigs were infused by an equal volume of saline ( $n=7$ ) under TVE. Liver biopsies were performed in pigs at 0, 3, 7, 14, 28, 35, 42, and 56 days posttransfection, respectively. All pigs tolerated the surgical procedures and survived well during the observation period.

### Luciferase Assay

Aliquots of the biopsied specimens of the liver were excised and immersed in 1200  $\mu\text{L}$  of 3X reporter lysis buffer, and then were cut with sterile scissors. The mixture was transferred to a 15 ml falcon tube and homogenized using a sonicator for 5–10 min, followed by centrifugation at 3,000 rpm for 5 min. The supernatant was then transferred into a 1.5 ml eppendorf tube. Aliquots were assayed for luciferase activity in a Lumat LB9501 luminometer (Berthold Systems, Alquiappa, PA) using 20  $\mu\text{l}$  of supernatant and 100  $\mu\text{l}$  of reconstituted luciferase-assay reagent (Promega, Madison, WI). The light units produced were measured for 20 sec, 3–5 min after mixing. Relative light units (RLU) were normalized to milligrams of sample proteins, as determined by the Bradford protein assay (Biorad).

### $\beta$ -Gal Histochemistry

To evaluate the transfection efficiency of HVJ-liposome into the porcine liver in vivo, the animals were generally anesthetized and the liver was biopsied. The tissue specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and 0.25% glutaraldehyde for 3 h at  $4^\circ\text{C}$ , and then were rinsed three times with PBS. To detect the expression of  $\beta$ -galactosidase, the fixed tissue specimens were stained with X-gal (Nakarai, Kyoto, Japan) for 6 h and then were counterstained by hematoxylin, as described previously (29). The transfection efficiency was as-



**FIGURE 1.** Surgical procedure of total vascular exclusion for selective gene transfer into pig liver in vivo by HVJ-liposome. The liver was isolated from the surrounding tissues and during the 15-min clamping of supra- and infra-hepatic vena cava and hepatic artery, the portal vein was cannulated and infused with reporter gene loaded-HVJ-liposome solution at a flow rate of 5 ml/min. RLL, right lateral lobe; RML, right median lobe; LML, left median lobe; LLL, left lateral lobe; PV, portal vein; HA, hepatic artery; IVC, inferior vena cava.

essed by counting the blue-stained cells in 10 randomly selected fields under a magnification  $\times 100$  followed by counting the blue stained cells using NIH image Macintosh software.

#### RT-PCR Analysis of LacZ mRNA

The pigs were sacrificed and the liver, lung kidney, spleen, and ovary were removed to evaluate any transgene expression by RT-PCR for LacZ mRNA at the indicated time points. Total RNA was extracted from those samples by the acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (30). Complementary DNA was synthesized from 2.0  $\mu\text{g}$  total RNA with 200 U moloney-murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Gibco) and 2  $\mu\text{g}$  oligo dT primer in 25  $\mu\text{l}$  reaction buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.3], 70 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT) for 1 h at 37°C, and then was quenched by heating at 70°C for 10 min. A 2.0  $\mu\text{l}$  aliquot of the cDNA reaction mixture was subjected to a polymerase chain reaction (PCR) analysis. The primers used for LacZ were 5'-GCG AAT ACC TGT TCC GTC AT - 3' (upstream; position 1895-1915 relative to the start codon) and 5'-TAC GCC AAT GTC GTT ATC CA - 3' (downstream; position 2361-2381), yielding a 467 bp PCR product. As an

internal control for the RT-PCR reaction, a 312-bp fragment of  $\beta$ -actin mRNA was also amplified in separate tubes. The sequences of primers for  $\beta$ -actin were 5'-TCC TCC CTG GAG AAG AGC TA - 3' (upstream; position 700-719) and 5'-AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA - 3' (downstream; position 992-1011) (31). PCR was performed in 50  $\mu\text{l}$  reaction mixture (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs, 2.5 U Taq DNA polymerase, and 0.5 mM oligonucleotide primers) with the thermal profile as follows; 1 min at 95°C, 1 min at 55°C, and 2 min at 72°C. LacZ and  $\beta$ -actin were amplified for 34 and 28 cycles, respectively. Initially, the amount of input RNA and the number of amplification cycles were optimized to ensure that the PCR products were quantified during the exponential phase of amplification. An almost linear relationship was found between the amounts of RNA and PCR products when 1.0 to 5.0  $\mu\text{g}$  total RNA was used in the reverse transcription reaction and PCR amplification for LacZ and  $\beta$ -actin was continued for 32-36 and 26-30 cycles, respectively. After amplification, 5  $\mu\text{l}$  of each product was electrophoresed in 1.5 % agarose gel.

#### Analysis of Organ Toxicities

As a parameter of organ injury, aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (T-Bil.), lactic dehydrogenase (LDH), and creatinin (Cr.) were measured using an automated analyzing system at 0, 1, 3, 7, 14, and 28 days after transfection, respectively. To evaluate the pathologic changes of the organ tissues, formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from lung, spleen, kidney, heart, and ovary were sectioned, and stained by hematoxylin and eosin.

#### Statistical Analysis

The data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney *U* test.  $P < 0.05$  was defined as significant.

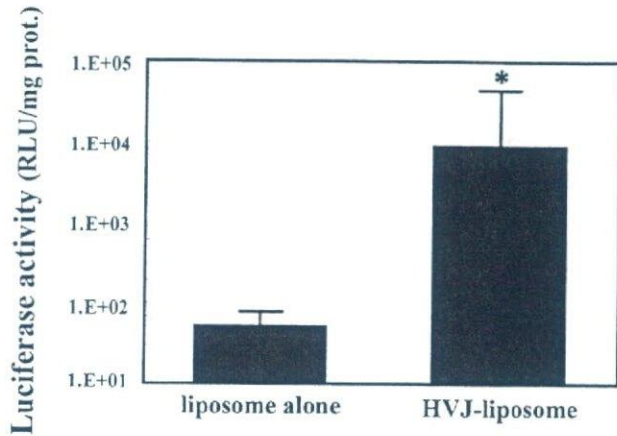
## RESULTS

#### Fusion of HVJ with the Liposome Greatly Increases the Transfection Efficiency in Cultured Porcine Hepatocytes

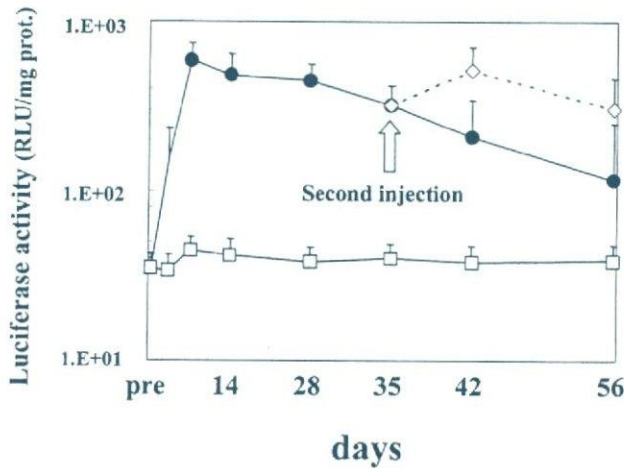
To confirm the necessity of the HVJ to enhance liposome mediated transfection, we compared the transfection efficiency between liposome alone and HVJ-liposome. As expected, 167 times more efficient transfection efficiency was observed by luciferase assay (Fig. 2).

#### Time-Course Analysis of Transfection Efficiency

To determine the duration of the transgene expression in the liver, the luciferase assays were performed. In brief, firefly luciferase genes (1000  $\mu\text{g}$  and 200  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA, respectively) were injected into the porcine liver via the portal vein under TVE ( $n=7$ ), and those transfected pigs underwent liver biopsies under general anesthesia at 0, 3, 7, 14, 28 days after transfection. As shown in Figure 3, the relative luciferase activities of the liver tissue specimens increased after 3 days ( $390 \pm 125\text{RLU}$ ) and peaked at 7 days after transfection ( $1473 \pm 325\text{RLU}$ ). The pigs which received a second injection of the luciferase genes on day 35 reactivated the luciferase activity up to a maximum on day 42



**FIGURE 2.** Comparison of transfection efficiency between HVJ-liposome and liposome alone in cultured porcine hepatocytes. Luciferase gene was transfected into primary hepatocytes in vitro using HVJ-liposome or liposome alone. As expected, 167 times more efficient transfection efficiency was observed in the HVJ liposome transfected group than in the liposome alone transfected group according to the luciferase assay. \* $P < 0.05$ .



**FIGURE 3.** Duration of luciferase gene expression after gene transfer. The porcine livers were transduced with luciferase gene-loaded HVJ-liposome via the portal vein through the inserted catheter under TVE. Serial liver samples were obtained at the indicated time points. The relative luciferase activity in the luciferase gene transfected group reached its highest at 7 days after the gene transfer and continued to be detected for up to 28 days. Second injection of the luciferase gene loaded-HVJ liposome could again increase the luciferase activity, which clearly indicates that HVJ-liposome is not an immunogenic vector. Closed circle, single injection (transfection) group; open rhombus, second injection group; open square, nontransfected group.

**In Vivo Gene Transfer of LacZ Gene into the Porcine Liver**

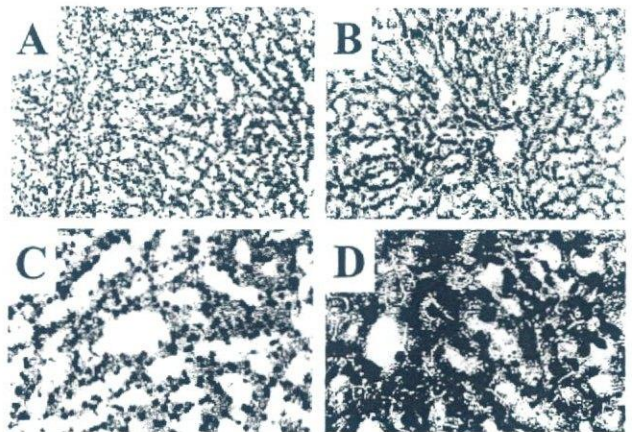
The transfection efficiencies of the HVJ-liposome targeting the porcine liver in vivo was evaluated by  $\beta$ -gal staining after the LacZ reporter gene transfer. Approximately 15% of the parenchymal hepatocytes and 30% of nonparenchymal hepatocytes were positively stained positively for  $\beta$ -gal, but no positive staining was seen in the control groups (Fig. 4,  $n = 7$ ). No extrahepatic transgene expression was found in the other organs such as the lung, spleen, kidney, heart, and ovary (data not shown). These data demonstrated that the exogenous gene could be efficiently and selectively delivered to the liver in vivo using HVJ-liposome.

**LacZ mRNA Expression**

To examine the expression of the reporter LacZ gene mRNA in the various organs, reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) was performed ( $n = 7$ ). These data showed LacZ gene expression to be detected in the  $\beta$ -gal-HVJ liposome transfected liver up to 14 days later. The control liver tissues specimens did not demonstrate any positive expression (Fig. 5). In contrast, faint mRNA expressions of LacZ in lung and kidney tissue specimens were detected, but not in specimens from the spleen or ovary.

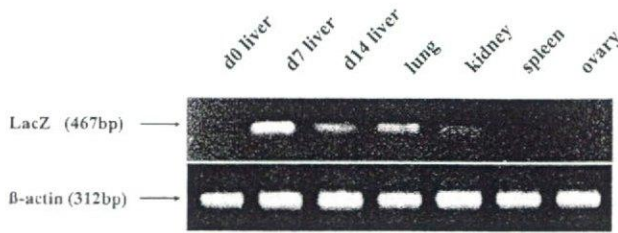
**Evaluation of Organ Injury**

Serial serum samples were examined for ALT, T-Bil, LDH, and creatinine. The values of ALT and T-Bil slightly increased up to day 3, and the value of LDH increased up to 7 days after transfection. The creatinine level, which is an indicator of renal insufficiency, did not change significantly within the first 14 days after transfection. All of those parameters became normalized within 28 days after transfection (Fig. 6). The histopathologic findings of various organs including the liver, lung, kidney, spleen, and ovary revealed an almost completely normal architecture.



**FIGURE 4.** Transgene expression by X-gal histochemistry of porcine liver. The cells successfully transduced by *E. coli*  $\beta$ -galactosidase turned blue. The  $\beta$ -gal positive cells were detected in the  $\beta$ -gal-HVJ liposome injected porcine liver (B, D), but not in the saline injected liver (A, C). Upper panel,  $\times 200$ ; lower panel,  $\times 400$ .

( $1293 \pm 335$ RLU). The luciferase activities of the control animals remained constant at a background level during the observation period.



**FIGURE 5.** Distribution of the transfected genes analyzed by RT-PCR for LacZ mRNA. LacZ mRNA expression in the liver reached its highest level at 3 days after gene transfer, and continued to be detected up until the 14th day. Extrahepatic transgene expressions were observed in the lung and kidney, but not in the spleen or ovaries at 3 days after gene transfer.

**DISCUSSION**

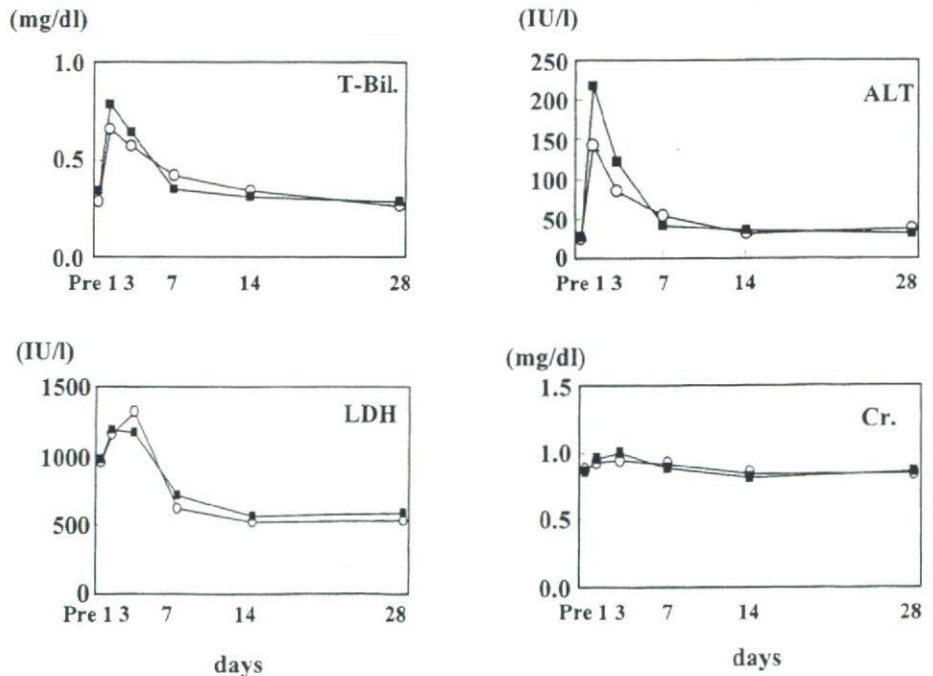
Clinical trials of human gene therapy have been performed over the past decade where, in most cases, the data obtained from experimental studies could not precisely predict the efficacy in humans. The most critical issue may thus be attributable to the insufficient levels of transfection efficiency and the unwanted toxicities of such viral vectors (32). Therefore, studies which evaluate the efficacy and safety in a suitable animal model have recently increased in importance before clinical studies can be started.

Rodents have proven to be remarkably useful models for the assessment of vector systems for gene therapy applications, including liver transplantation. However, clinical results suggest that the efficacy of gene transfer in humans cannot be reliably predicted from rodent studies. This is probably due to the physiological and anatomical differences between the livers of rodents and humans. Pigs, sheep, or primates

may be better models for this purpose as their livers share similarities in size, anatomy, physiology and ultrastructure with those of the human liver. Particularly, pigs have been gaining a constant attention as a possible candidate for liver xenografts in the future, to satisfy the shortage of donor organs, which remains a critically important issue that needs to be addressed in liver transplantation. In the present study, we therefore evaluated the efficacy and safety of the HVJ-liposome mediated gene transfer in a pig model.

Conceptually, HVJ should be able to attach itself to the target cell through the fusion process. Asialoglycoprotein receptors (ASGPR) are predominantly expressed on the surface of mammalian hepatocytes, and they are responsible for the clearance of glycoproteins from the circulation by receptor mediated endocytosis. Normally, the sendai virus binds to the cell surface sialic acid residues by way of F-glycoprotein, which mediates the fusion of the viral envelope with the cell plasma membrane at neutral pH. In addition, F-glycoprotein contains a  $\beta$ -galactose-terminated carbohydrate moiety, which binds to ASGPR at the hepatocyte plasma membrane (33–35). Based on these findings, we previously demonstrated, for the first time, gene transfer into porcine hepatocytes using the HVJ-liposome method to be feasible (36).

The present study clearly shows that such surgical pretreatment would not induce any detrimental effects regarding the general condition of the pigs based on the results of biochemical parameters. In addition, the transgene distribution to extrahepatic tissues had no demonstrable negative effects, as determined based on clinical evaluations and a full histopathological analysis of tissue specimens harvested at necropsy (data not shown). The transfection efficiency obtained in the present experiments was 15% in porcine hepatocytes and 30% in nonparenchymal hepatocytes, which thus appears to be low in comparison to the data obtained from



**FIGURE 6.** Biochemical changes in pigs after gene transfer. The levels of total bilirubin and aspartate aminotransferase were elevated in both of the groups 24 hours after gene transfer; however, those levels all normalized within 1 week. Only minor changes were observed in the creatinine and LDH levels in both groups.