

8. ABO 血液型不適合生体肝移植の現況

Current status of ABO-incompatible living donor liver transplantation

1. 慶應義塾大学医学部外科

2. 慶應義塾大学医学部病理

田辺 稔¹・島津 元秀¹・星野 健¹・淵本 康史¹・河地 茂行¹

Minoru Tanabe

(講師)

Motohide Shimazu

(助教授)

Ken Hoshino

(講師)

Yasushi Fuchimoto

(講師)

Shigeyuki Kawachi

(助手)

尾原 秀明¹・入江 理恵²・坂本 亨宇²・森川 康英¹・北島 政樹¹

Hideaki Ohara

(助手)

Rie Irie

(助手)

Michiie Sakamoto

(教授)

Yasuhide Morikawa

(教授)

Masaki Kitajima

(教授)

Summary

Key Words

生体肝移植, ABO 血液型不適合生体移植,
液性拒絶反応, リツキシマブ

ABO 血液型不適合生体肝移植では、抗ドナー血液型抗体によって肝壊死や難治性肝内胆管障害が発生する。このリスクはレシピエントの年齢が1歳以上で有意となり、特に成人症例では極めて移植後の成績が不良なため、多くの施設で成人血液型不適合生体肝移植は原則禁忌とされてきた。1998年に筆者らが考案した門脈内注入療法(門注療法)は、ABO血液型不適合成人生体肝移植の術後成績を改善する大きな手がかりとなった。その後、京都大学グループによって開発された肝動注療法とともに、グラフト肝の局所治療はわが国の ABO 血液型不適合成人生体肝移植の多くの症例に使用されるようになり、術後生存率は局所治療導入前に比べて飛躍的に向上している。最近ではさらに、抗 CD20 モノクローナル抗体(リツキシマブ)による液性免疫の制御が試みられ、その効果が注目されるなど、ABO 血液型不適合生体肝移植はより現実的な医療として発展しつつある。

はじめに

1989年の本邦生体部分肝移植初例から十数年が経過し、すでに全国の蓄積症例数は3,000例を超えた。また、その術後成績は欧米の脳死肝移植と比較しても良好であり、わが国でもこの医療が多くの末期肝疾患患者を救済する強力な手段として確立されたことを示している。わが国では年間2,000人以上が肝移植を必要としていると推定されているが、肝移植が実際に行われているのはこのうちの一部であり、その主たる原因としてドナー不足の問題がある。国内の脳死肝移植は年間数例行われるのみで、脳死ドナーが不足していることは言うまでもないが、生体肝移植においてもさまざまな理由で適当な臓器提供者が見つからないケースが多数認められる。臓器提供不適格の理由としては、ドナー候補者の年齢、健康状態、提供意志の有無、肝容積など多々あるが、なかでも ABO 血液型不適合はその主因に数えられる。ド

ナーとレシピエントの ABO 血液型が不適合の場合、ドナー血液型抗原に対する既存抗体が激しい液性拒絶反応を惹起するため、術後成績は極めて不良である。京都大学の江川らの報告¹⁾によると、この液性拒絶反応には2つの臨床型があり、術後1~2週で発症し1ヵ月以内で肝壊死に至る「肝壊死型」と、術後2~3ヵ月で発症し肝内胆管の広狭不整を来して胆管炎を繰り返しながら肝不全に至る「肝内胆管炎型」に分類される。これらの反応は血液型抗原に対する抗体産生能がまだ確立されない1歳以下の小児には認められないが、肝内胆管炎は1歳以上から、より激しい肝壊死は8歳以上から認められるという。これらレシピエントの年齢による反応性の違いは移植後の生存率にも反映され、レシピエントの年齢が1歳未満、1歳以上8歳未満、8歳以上16歳未満、16歳以上のそれぞれの5年生存率は、76%、68%、53%、22%と報告されている。したがって、特に術後成績

が悪い成人患者における ABO 血液型不適合生体肝移植は原則禁忌とされてきた。血液型適合生体ドナーが見つからない場合、年間数件しか行われない国内脳死肝移植のウェイティングリストに登録して血液型適合ドナーからの臓器提供を待ち続けるか、多額の私費を投じて海外で移植を受けるかしか道はない。したがって、さらに多くの末期肝疾患患者を救うためには、脳死体肝移植を国内で普及させる一方で、現実的には臓器提供可能な生体ドナープールを拡大させる目的で、ABO 血液型不適合生体肝移植の成功率を上げる必要がある。本稿では、ABO 血液型不適合生体肝移植の歴史と現況について述べる。

ABO 血液型不適合生体肝移植の歴史

当初、肝臓の場合は心臓や腎臓移植と異なり、免疫学的に“tolerogenic”なため、ABO 血液型の異なるドナーからでも移植が可能とされていた。しかし、1980 年代後半～1990 年代前半に行われた ABO 血液型不適合移植のトライアルでは、高率に重度急性拒絶反応が発生するとともに、肝壊死、肝動脈血栓症、難治性胆管合併などを併発し、術後経過が極めて不良であることが明らかにされた²⁾。ピッツバーグの Demetris らは、血液型不適合肝の病理学的所見の特徴として、類洞内皮や小動脈内皮に抗体の沈着と肝実質の出血性壊死などをあげ、この現象を「single organ DIC」と称した³⁾。これまで血漿交換による抗体除去、カルシニューリンインヒビターやステロイド

増量、シクロフォスファミドや抗 T リンパ球抗体の併用など、あらゆる方法が試されてきたが、これらは ABO 血液型不適合生体肝移植後の拒絶反応を十分に抑制できないばかりか、重症感染症のリスクを増加させた⁴⁾。時に散発的成功例が報告されるものの再現性に乏しく、特に成人例において有効な解決方法が見出されない現状があった。

歴史的にみれば、腎移植でも ABO 血液型不適合の壁が同様に存在し、先に述べた血漿交換による抗体除去、脾摘、カルシニューリンインヒビターやステロイド増量、シクロフォスファミド(またはアザチオプリン)などの併用は、むしろ拒絶に弱いとされてきた腎移植のみで効果が実証され⁵⁾、本邦でも広く臨床的成果をあげている⁶⁾。特に 2001 年以降の本邦 ABO 血液型不適合生体腎移植は 3 年生着率で 94% に達している⁸⁾。小動物レベルの移植実験では、拒絶反応のコントロールは細胞性・液性にかかわらず、おおむね肝は他臓器に比較して制御しやすい。血管系に交通があり動脈・門脈の二重血行支配を受けている肝と比べると、腎の動脈系は終末動脈であり、抗体の血管内皮沈着による「single organ DIC」は腎に対して不利と考えられる⁷⁾。しかし、臨床の場では「肝・腎逆転現象」が起こっているわけで、これは血液型抗原という特殊性を考慮しても、やや意外な結果であった。ABO 血液型不適合生体肝移植の予後の悪さの原因として胆管上皮の血液型抗原の存在を指摘する意見もあるが、腎尿細

管上皮でも同様の血液型抗原の発現がある。臨床の ABO 血液型不適合生体腎移植ではそれなりの成果が出ている抗拒絶療法が、肝移植ではその効果が不十分であり、「肝壊死」や「難治性肝内胆管障害」を引き起こす。移植時のレシピエントの年齢が 1 歳以上でこの合併症が増加し、年長児、成人の順にリスクが増加するため、成人患者では緊急避難的な場合は除き、ABO 血液型不適合生体肝移植は原則禁忌とされてきた。

門注療法の考案

1998 年に当院に訪れた原発性胆汁性肝硬変患者(52 歳、女性)は血液型適合ドナーが身内になく、ABO 血液型不適合生体肝移植を避けられない状況にあった。当時、成人患者に対する ABO 血液型不適合生体肝移植の成績は極めて悪く、門注療法はこの患者に対する生体肝移植を成功に導くために考案された。結局、この成人レシピエントは肝壊死や肝内胆管合併症はもとより、1 回の拒絶反応を来すことなく退院し、7 年以上経過した現在も低用量タクロリムスの単剤のみで良好な肝機能を維持し、通常の日常生活を謳歌している。筆者らはこの門注療法を 2002 年に論文として報告⁹⁾するとともに、プロトコルを他施設にも提供し、徐々に症例数が増加するにつれて、その有効性が認知されるようになった。2005 年日本 ABO 血液型不適合移植研究会の集計では、門注療法を行った 16 歳以上の ABO 血液型不適合生体肝移植症例の 5 年生存率は約 60% まで

上昇している¹⁰⁾。厳密な比較試験ではないが、門注療法を行わない症例の5年生存率は約20%であるので、その差は歴然としている。以下は門注療法 of 考案に至った経緯である。

拒絶反応対策を決定するにあたっては、ABO血液型不適合の壁を乗り越えた腎移植のプロトコール(血漿交換による術前後の抗体除去、術中脾摘、ステロイド、タクロリムス、シクロフォスファミドの併用)を基本に据えた。ただし、前述のようにこの治療のみでは成人間のABO血液型不適合生体肝移植を乗り切ることが困難なことは既知の事実であったので、追加の治療を考慮せねばならなかった。筆者らは過去の文献的考察から、全身的な免疫抑制を強化しても既存の薬剤・治療法では限界があり、このグラフト局所に激しい「single organ DIC」を制御するにはグラフトに対する局所治療がより効果的と考えた。薬剤投与経路としては、当初肝動注も考慮されたが、手技的安全性から経門脈的投与が選択された。ABO血液型不適合生体移植における「single organ DIC」は、抗体の血管内皮への沈着から始まり、補体、血小板、サイトカインカスケードの活性化など多方面の関与が考えられるため¹¹⁾、酢酸メチルプレドニゾロン(広い免疫抑制と抗炎症作用)、gabexate mesilate (FOY: 抗血小板、抗凝固因子、抗炎症性サイトカイン作用等)、プロスタグランジンE₁(微小循環改善、抗血小板作用等)の3剤を選択した。高容量のステロイドとプロスタグランジンE₁の全身投与は、液性

拒絶にかかわるリンパ球クロスマッチ陽性の肝移植でその効果が報告され¹²⁾、またプロスタグランジンE₁の門注は大動物実験で移植肝の動脈血流量を増加させることが当教室の河地らによって示されている¹³⁾。さらに、対象疾患は異なるが、免疫学的障害が原因となる重症潰瘍性大腸炎に対するステロイド動注療法の効果も報告されており、これらが門注薬剤選択の根拠となった。このような理由で決定された全身的・局所的免疫抑制は、特にステロイドの総投与量を増加させるため、感染症など副作用を重篤にさせないためにもどれだけの期間これらの治療を継続するかが問題となった。ABO血液型不適合生体腎移植では、術後3週間以降はほとんど液性拒絶を認めないとの報告があることから⁹⁾、重症感染症を避けるために門注療法の期間を3週間と定め、さらにこの時点で意図的に経口タクロリムスの減量(トラフレベル10 ng/mL未満)とステロイドの減量を行うことにした。術後の血中ドナー血液型抗体価が32倍以上に上昇した時点で血漿交換を行ったが、3週間以降のなだらかな抗体価上昇は文献的考察から問題なしと判断し、放置した。以上の経緯によりつくられたプロトコールは、その後の経験から多少変更されたが、おおよそとして現在も変わらない(表1)。

門注療法の画期的な部分は、グラフト局所の免疫制御の有用性を臓器移植の臨床で初めて示したところにある。当然のことながら、臓器移植の拒絶反応はグラフト局所で起こるが、その背

景にあるのはレシピエントの全身に存在する免疫系へのグラフト抗原の曝露と感作であり、移植後の免疫抑制は全身的なものを中心になることは言うまでもない。グラフト局所の免疫抑制の効果は、一時代前に実験動物レベルでのみ示されたが、その後、臨床応用に至らなかった。その理由は、技術的にグラフト局所に薬剤を投与することが困難であったことと、より根源的な全身的免疫抑制が発達して明らかな有効性を示したからに他ならない。すべての臓器移植の成績は1980年代以降著しく向上しているが、これらは全身的な免疫抑制剤の発達、つまりカルシニューリンインヒビター、ステロイド、代謝拮抗剤、OKT3、抗IL-2R抗体などの臨床応用に基づいている。ABO血液型不適合臓器移植の分野では、これらの免疫抑制剤の強化に加え、血漿交換による抗体除去、脾摘などの全身的なアプローチが歴史的に行われてきた。しかし、これら「全身的免疫制御」の強化のみでは重症感染症を増やすのみで、少なくともABO血液型不適合生体肝移植の術後成績の改善は得られなかった。ABO血液型不適合生体肝移植における「局所治療」としての門注療法の位置付けは、従来の全身性免疫制御法と併用することで相加的または相乗的に働き、これまで克服できなかった液性拒絶を制御することにある。

肝動注療法

門注によるグラフト局所の免疫制御により、ABO血液型不適合生体肝移

表1 門注療法を中心とした成人 ABO 血液型不適合生体肝移植のプロトコールの概略(リツキシマブを除く)

術前	
免疫抑制剤	・シクロフォスファミド：100 mg/day 点滴静注(-7 POD)。 ・術前抗体価×512 倍以上の場合は術前からステロイド等併用。 ・タクロリムス：1 mg 経口(-1 POD 夜～)
血漿交換	・抗ドナー抗体価(IgM, IgG) 32 倍以下を目標(-7 POD ～)。
術中	
脾摘	・再灌流後に摘出。
門脈カテーテル	・中結腸静脈より挿入し下記門注療法開始。
術後	
血漿交換	・術後3週間以内の急激な抗体価の上昇(原則32倍以上)で施行。
免疫抑制*	・タクロリムス：目標トラフレベルは15 ng/mL 前後(~21 POD), 22 POD より10 ng/mL 未満に減量。 ・ステロイド(静注, 経口)：通常の血液型適合生体肝移植に準ずる。22 POD よりPSL 5 ~ 10 mg/day に減量。 ・シクロフォスファミド：100 mg/day 静注(1 ~ 21 POD)。22 POD よりミゾリピンに変更。
門注療法*	・メチルブレドニゾロン：持続門脈注入。125 mg/day (0 ~ 7 POD) 50 mg/day (8 ~ 14 POD)以降1週間かけて漸減後21 POD で投与終了。 ・gabexate mesilate (FOY)：持続門脈注入。1000 mg/day (0 ~ 14 POD) ・プロスタグランジン E ₁ ：持続門脈注入。0.005 ~ 0.01 μg/kg/min (0 ~ 14 POD)

*：門注療法は21 POD までとし、感染防御のため、全身免疫抑制は22 POD より意図的に減量する。

植の成績は明らかに向上したが、依然として約20%に液性拒絶がみられ、また脾摘と門脈カテーテルが原因と考えられる門脈血栓の合併症が指摘され、2002年より京都大学において新たな局所治療としての肝動注療法が導入された⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。理論的に肝動注の優れている点は、門注に比して注入薬剤がグラフト肝の隅々まで行きわたるであろうこと、さらに液性拒絶のターゲットとなる胆管系は肝動脈血流に依存していることから、胆管系に薬剤を到達させるためには肝動注が必要であろうことなどがあげられる。一方で、肝動脈は高圧系であるとともに細くて脆弱である。そこに留置されたカテーテルにより血栓や出血などの合併症を起こせば、グラフト肝不全や大出血に至る可能性が潜在的に存在する。京都大学では特

殊なゴムバンドによる肝動脈カテーテルの留置法を開発し、再開腹することなく安全にカテーテルを抜去することが可能になったと報告している⁽¹⁴⁾。肝動注療法の導入初期のレシピエント生存率は一時80%を越えたが、2005年日本 ABO 血液型不適合移植研究会の全国集計では、肝動注療法と門注療法の生存率の差は10%以内にとどまっている⁽¹⁶⁾。

リツキシマブ(Rituximab, 抗 CD 20 モノクローナル抗体)の導入

骨髄でつくられた B 細胞前駆細胞は脾臓やリンパ節で成熟 B 細胞に分化し、最終的には抗体を産生する形質細胞に分化する。CD 20 抗原はプレ B 細胞から成熟 B 細胞に発現し、形質細胞には認められない。リツキシマブ

は抗 CD 20 モノクローナル抗体であり、B 細胞表面に発現する CD 20 抗原に特異的に結合した後、補体依存性細胞傷害反応(complement-dependent cytotoxicity : CDC)および抗体依存性細胞性細胞傷害反応(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity : ADCC)により B 細胞を破壊する。抗体を産生する形質細胞は CD 20 を発現しないため、リツキシマブにより破壊されることはないが、形質細胞に分化する手前の B 細胞を枯渇させることによって抗体産生能を低下させる機序が考えられている。本来リツキシマブは、CD 20 陽性の B 細胞性非ホジキンリンパ腫に対する治療薬として開発されたものであり、移植の分野では移植後リンパ増殖性疾患(post-transplant lymphoproliferative disorder)

表2 慶應義塾大学病院における ABO 血液型不適合生体肝移植に対する門注療法の成績(成人・年長児)

原疾患	年齢(歳)	血液型組合せ	門注療法	リツキシマブ	生存期間(日)	生死
原発性胆汁性肝硬変	52	A → O	(+)	(-)	2683	生存
劇症肝炎	42	AB → A	(+)	(-)	2117	生存
B 型肝炎硬変	46	A → O	(+)	(-)	16	死亡
劇症肝炎	22	B → O	(+)	(-)	139	死亡
リツキシマブの導入						
胆道閉鎖症	12	A → B	(+)	(+)	639	生存
C 型肝炎硬変	58	B → O	(+)	(+)	387	生存
胆道閉鎖症	24	A → O	(+)	(+)	359	生存
原発性胆汁性肝硬変	39	B → O	(+)	(+)	338	生存
胆道閉鎖症	9	B → O	(+)	(+)	310	生存
原発性胆汁性肝硬変	42	B → O	(+)	(+)	268	生存
胆道閉鎖症+C 型肝炎硬変	26	A → O	(+)	(+)	254	生存

der : PTLD)の治療薬として有名である。近年、リツキシマブのB細胞破壊による液性免疫の抑制効果が注目され、抗体が関与すると考えられる自己免疫性疾患¹⁶⁾や液性拒絶反応に対する有効性が報告されるようになった。臓器移植の分野では、ABO血液型不適合またはリンパ球クロスマッチ陽性の腎移植に対する術前投与や¹⁷⁾¹⁸⁾、心・肺移植後の液性拒絶反応に対するレスキュー治療など¹⁹⁾²⁰⁾、肝移植以外の報告が先行した。最近では国内を中心にリツキシマブをABO血液型不適合生体肝移植に用いる試みがいくつかの施設で始まっている¹⁵⁾²¹⁾。

筆者らは従来の門注療法にリツキシマブの術前投与を加え、7例のABO血液型不適合生体肝移植(年長児2例、成人5例)に用いた(表2)。成人の場合、リツキシマブ(500 mg/body)を術前2回、術直後1回投与した(年長児では一部変更)。術前の血漿交換また

はDFPP(double filtration plasmapheresis)による抗体除去、術中脾摘は全例に行い、門注薬剤は原法どおりプロスタグランジンE₁+ステロイド+FOYの3剤併用とした。興味深いことに、肝壊死や難治性肝内胆管障害などのABO血液型不適合生体肝移植に独特の合併症はもとより、通常の細胞性拒絶反応でさえ1回も起こすことなく全例が退院し、術後7~18ヵ月を経た現在も良好な肝機能を維持している。リツキシマブ導入前には4例のうち2例を失ったが、門注療法にリツキシマブを併用することによって、液性拒絶や肝内胆管障害を有効に阻止することが可能となった。サイトメガロウイルス(cytomegalovirus : CMV)感染に関しては全例が血中で抗原陽性となり、うち2例で発熱や腸炎が顕性化した。1例は術後数ヵ月間にわたってCMV抗原陽性化を繰り返したが、いずれも抗ウイルス剤の投与によ

り治癒した。本プロトコールでは、通常のABO血液型適合生体肝移植と比較して強い免疫抑制状態になるため、より嚴重な感染症の管理が必要となることは言うまでもない。特に、門注療法は術後3週間で中止し、タクロリムスやステロイドの経口投与量も22 PODから意図的に減量し、過剰の免疫抑制を防ぐことが感染予防のために重要と考えている。筆者らの経験では、術後3週間を無難に乗り切った患者の場合、その後免疫抑制剤を通常量よりさらに減らしても、特に拒絶反応や肝内胆管障害を起こすことはなかった。したがって、ABO血液型不適合生体肝移植では、移植後最初の3週間に液性免疫の不应状態を成立させる何かが起こるものと推察している。

脾摘による脾静脈血流鬱滞と門注カテーテル留置による合併症とされる門脈血栓は1例のみで、しかも小血栓であったため門脈血流障害を来すこと

なく経過した。もともと門注療法における門脈血栓は、筆者らの施設ではあまり問題視されていない。多くの施設では下腸間膜静脈から門脈カテーテルを挿入し、その血流を遮断するため、脾摘後の脾静脈血流は高度に鬱滞し血栓形成の原因になっているものと思われる。筆者らは門脈血栓を防ぐために門脈カテーテルを中結腸静脈末梢から挿入し、下腸間膜静脈から脾静脈への血流を温存するとともに、先端は門脈本幹にわずかに出る程度で固定している。原法である3剤併用門注療法は一部の他の施設でFOYが省かれるようになったが、FOYには抗凝固剤としての作用もあり、門脈血栓の防止にも役立っているものと考えている。門脈カテーテルの中結腸静脈挿入部は、抜去時の出血を防ぐために伸縮性のある糸で固定している。筆者らはこれまで血液型適合症例も含めて50例以上の門脈カテーテル使用経験があるが、門脈は低圧系であるがゆえにカテーテル抜去時の出血は皆無であり、その安全性は極めて高い。

今後の課題

門注療法の導入がきっかけとなり、肝動注療法を含めたグラフト肝に対する局所治療は、わが国の成人ABO血液型不適合生体肝移植における標準治療となりつつある。2005年の全国集計では、過去に233症例のABO血液型不適合生体肝移植が行われ、16歳以上の97症例の多くにグラフト肝局所治療が行われている¹⁰⁾。ただし、最近の肝動注療法には脾摘を行わない症

例が多く含まれており、また門注療法の中にもプロスタグランジンE₁+ステロイド+FOYの3剤併用の慶應大学原法と、他施設で行われているFOY以外の2剤を門注する変法が混在している。局所治療がこの分野に大きな進歩をもたらしたことは間違いないが、門注療法と肝動注療法の優劣を語るには、挿入方法や使用薬剤の量や種類、脾摘の有無などの背景因子を合わせた比較検討が必要である。また、筆者らの経験では、門注療法にリツキシマブを併用した7症例の術後経過はほぼ満足すべきもので、今後局所療法とリツキシマブの併用が主流になることが予測される。過去を振り返ると、ABO血液型不適合生体肝移植の成功率を上げるために、通常の免疫抑制剤に脾摘や血漿交換が加わり、さらに近年局所療法が付加されることで成功率が上がり、これからはリツキシマブが併用されるケースが増えるであろう。次々と治療法を加えることで血液型不適合の壁を乗り越えてきたが、当然レシピエントごとに液性拒絶の強度は異なるはずで、すべてのレシピエントにすべての治療法を使用すべきかどうかは検討の余地がある。血漿交換前の抗ドナー抗体価が極めて高い症例や成人患者などのハイリスク群では全治療を行い、逆に小児や低抗体価の患者では脾摘やリツキシマブを省くなどの工夫が必要となるであろう。

おわりに

特に成人や年長児において術後成績が不良であったABO血液型不適合生

体肝移植は、ここ数年の治療法の進歩によってより現実的な治療に近づいた。患者生存率は着実に上昇し、術後急性期の数ヵ月を乗り切れれば、通常のABO血液型適合生体肝移植と同様に全身状態は安定化し、健康的な社会生活を目指すことが可能となる。しかしその一方で、これまで施行された成人症例ははまだ全国で100例に満たず、追加治療の煩雑さやその経済的負担、さらに感染症対策などの課題が残されており、決してABO血液型適合移植と同等になったわけではない。今後、症例数を増やしながらか、これらの問題を解決していかなければならない。

文献

- 1) Egawa H, Oike F, Buhler L, et al : Impact of recipient age on outcome of ABO-incompatible living-donor liver transplantation. *Transplantation* 77 : 403-411, 2004
- 2) Demetris AJ, Jaffe R, Tzakis A, et al : Antibody-mediated rejection of human orthotopic liver allografts. A study of liver transplantation across ABO blood group barriers. *Am J Pathol* 132 : 489-502, 1988
- 3) Gugenheim J, Samuel D, Reynes M, et al : Liver transplantation across ABO blood group barriers. *Lancet* 336 : 519-523, 1990
- 4) Farges O, Kalil AN, Samuel D, et al : The use of ABO-incompatible grafts in liver transplantation : a life-saving procedure in highly selected patients. *Transplantation* 59 : 1124-1133, 1995
- 5) Alexandre GPJ, Latinne D, Cianello P, et al : Preformed cytotoxic antibodies and ABO-incompatible grafts.

- Clin Transplantation 5 : 583-594, 1991
- 6) Takahashi K, Yagisawa T, Sonoda K, et al : ABO-incompatible kidney transplantation in a single-center trial. *Transplant Proc* 25 : 271-273, 1993
 - 7) 高橋公太 : ABO 血液型不適合腎移植. *日本移植学会誌* 33 : 145-160, 1998
 - 8) Takahashi K, Saito K, Takahara S, et al : Excellent long-term outcome of ABO-incompatible living donor kidney transplantation in Japan. *Am J Transplantat* 4 : 1089-1096, 2004
 - 9) Tanabe M, Shimazu M, Wakabayashi G, et al : Intra-portal infusion therapy as a novel approach to adult ABO-incompatible liver transplantation. *Transplantation* 73 : 1959-1961, 2002
 - 10) 日本 ABO 血液型不適合移植研究会 : 第 12 回学術集会, 肝移植の統計. 2005 年 7 月 31 日.
 - 11) Demetris AJ, Tsamandas AC, Delaney CP, et al : Pathology of Liver Transplantation. In : Busttil RW, Klintmalm GB, eds. *Transplantation of the Liver*. 681, Saunders, Philadelphia, USA, 1996
 - 12) Takaya S, Iwaki Y, Starzl TE : Liver transplantation in positive cytotoxic crossmatch cases using FK 506, high-dose steroids, and prostaglandin E₁. *Transplantation* 54 : 927-929, 1992
 - 13) Kawachi S, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, et al : Efficacy of intraportal infusion of prostaglandin E₁ to improve the hepatic blood flow and graft viability in porcine liver transplantation. *Transplantation* 64 : 205-209, 1997
 - 14) 江川裕人, 羽賀博典, 笠原群生, 田中紘一 : 生体肝移植とその短期および長期成績 : ABO 不適合移植. *外科* 66 : 1061-1066, 2004
 - 15) Yoshizawa A, Sakamoto S, Ogawa K, et al : New protocol of immunosuppression for liver transplantation across ABO barrier : The use of Rituximab, hepatic arterial infusion, and preservation of spleen.
 - 16) Zecca M, De Stefano P, Nobili B, et al : Anti-CD 20 monoclonal antibody for the treatment of severe, immunemediated, pure red cell aplasia and hemolytic anemia. *Blood* 97 : 3995-3997, 2001
 - 17) Sawada T, Fuchimoto S, Teraoka S, et al : Successful A1 to O, ABO-incompatible kidney transplantation after a preconditioning regimen consisting of anti-CD 20 monoclonal antibody infusions, splenectomy, and double filtration plasmapheresis. *Transplantation* 74 : 1207-1210, 2002
 - 18) Gloor JM, DeGoey SR, Pineda AA, et al : Overcoming a positive crossmatch in living-donor kidney transplantation. *Am J Transpl* 3 : 1017-1023, 2003
 - 19) Pierson III RN, Loyd JE, Goodwin A, et al : Successful management of an ABO-mismatched lung allograft using antigen-specific immunoadsorption, compliment inhibition, and immunomodulatory therapy. *Transplantation* 74 : 79-84, 2002
 - 20) Aranda JM, Scornik JC, Normann SJ, et al : Anti-CD 20 monoclonal antibody (rituximab) therapy for acute cardiac humoral rejection : a case report. *Transplantation* 73 : 907-910, 2002
 - 21) Usuda M, Fujimori K, Koyamada N, et al : Successful use of anti-CD 20 monoclonal antibody (rituximab) for ABO-incompatible living-related liver transplantation. *Transplantation* 79 : 12-16, 2005

Quantitative Analysis of Anti-Hepatitis C Virus Antibody-Secreting B Cells in Patients With Chronic Hepatitis C

Takeji Umemura,^{1,2} Richard Y.-H. Wang,¹ Cathy Schechterly,¹ J. Wai-Kuo Shih,¹ Kendo Kiyosawa,² and Harvey J. Alter¹

To investigate the quantitative characteristics of humoral immunity in patients with hepatitis C, we established an enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) assay for detection of anti-hepatitis C virus (HCV)-secreting B cells. Receiver operating characteristic curve analysis demonstrated 100% specificity and 58% to 92% sensitivity for detecting B-cell responses to NS5b, NS3, E2, and core antigens. The median sum of anti-HCV-secreting B cells to all HCV antigens tested was significantly higher in 39 patients with chronic hepatitis C (47.3 spot forming cells [SFCs]/10⁶ peripheral blood mononuclear cells [PBMCs]) than in 9 recovered subjects (15.3 SFCs/10⁶ PBMCs; $P = .05$) or 11 uninfected controls (5.3 SFCs/10⁶ PBMCs; $P < .001$); the significant difference ($P = .018$) in chronic versus recovered patients was in reactivity to nonstructural antigens NS3 and NS5b. Anti-HCV immunoglobulin M (IgM)-secreting B cells were also readily detected and persisted decades into HCV infection; there was no difference in IgM-positive cells between chronic and recovered patients. ELISpot reactivity to genotype 1-derived antigens was equivalent in patients of genotypes 1, 2, and 3. There was significant correlation between the numbers of anti-HCV IgG-secreting B cells and serum aminotransferase and to the level of circulating antibody. **In conclusion**, ELISpot assays can be adapted to study B-cell as well as T-cell responses to HCV. Measurement at the single-cell level suggests that humoral immunity plays a minor role in recovery from HCV infection and that B-cell immunity is strongest in those with persistent infection. (HEPATOLOGY 2006;43:91-99.)

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease worldwide. More than half of patients with acute HCV infection develop chronic hepatitis, leading to cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma in at least 20% of these patients.¹⁻³ Chronic HCV infection results in the induction of a strong humoral immune response, and measurement of anti-HCV antibodies in serum is widely used to screen for

HCV infection. Although several studies have examined the features of the humoral immune response to HCV,⁴⁻⁷ the quantitative characteristics of HCV-specific antibody production during infection remain undefined. In patients with acute hepatitis C, an early HCV-specific T-cell response is associated with viral clearance,⁸⁻¹¹ but the role of humoral immune responses in HCV clearance is unclear and appears to be subsidiary, because strong antibody responses are detected in all immunocompetent chronic HCV carriers. It is also unknown whether anti-HCV antibodies serve to control the level of viremia during chronic infection and whether they ameliorate horizontal or vertical transmission.

An enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) assay for detecting individual B cells secreting specific antibodies has enabled investigators to study B-cell immunity at a cellular level in a variety of clinical applications.^{12,13} The advantages of the ELISpot assay are that it can detect even a single cell out of 10⁶ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), whose secretion level may not be sufficient for detection of circulating antibody, and distinguishes and quantifies only active immunoglobulin-secreting

Abbreviations: ELISpot, enzyme-linked immunosorbent spot; HCV, hepatitis C virus; SFC, spot-forming cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; Ig, immunoglobulin; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; PBS, phosphate-buffered saline; ROC, receiver-operating characteristics; AUC, area under the curve; IQR, interquartile range.

From the ¹Department of Transfusion Medicine, Warren Grant Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, MD; and ²Department of Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan.

Received March 16, 2005; accepted August 29, 2005.

Address reprint requests to: Harvey J. Alter, M.D., M.A.C.P., Department of Transfusion Medicine, Warren Grant Magnuson Clinical Center, Building 10, Room 1C711, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-1184. E-mail: halter@cc.nih.gov; fax: 301-402-2965.

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

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

DOI 10.1002/hep.20917

Potential conflict of interest: Nothing to report.

cells. This assay thus provides a useful tool for better understanding immunity to infectious diseases and improved analysis of the immune response to vaccination.¹⁴ Although studies of antigen-specific antibody-secreting cells in various viral infections have been conducted,¹⁵⁻¹⁹ there are no published data on detection and quantification of anti-HCV antibody-secreting B cells.

The objective of this study was to adapt the ELISpot assay for the detection of anti-HCV antibody-secreting B cells to (1) clarify the HCV-specific humoral immune responses in patients with chronic hepatitis C, (2) examine the correlation between the numbers of anti-HCV antibody-secreting B cells and clinical outcomes, and (3) examine humoral immune responses in patients with chronic hepatitis C compared with those who spontaneously clear HCV.

Patients and Methods

Subjects. Individuals who were identified by the Greater Chesapeake and Potomac Region of the American Red Cross as being positive for anti-HCV via enzyme immunoassay at the time of blood donation were referred to the Department of Transfusion Medicine at the National Institutes of Health for participation in a long-term study of the natural history of HCV infection^{20,21}; 750 participants were enrolled from 1990 through September 2003. Of these, 48 subjects were selected randomly to assess humoral immune responses at the B-cell level. The chronic hepatitis C group included 39 subjects who were positive for anti-HCV antibodies (EIA-2 and RIBA-3) and positive for HCV RNA. The recovered group included 9 anti-HCV-positive subjects who were HCV RNA-negative via qualitative polymerase chain reaction on at least two consecutive visits. The patients' characteristics are summarized in Table 1. Eleven volunteer blood donors without a history of HCV infection served as controls. All subjects were negative for hepatitis B surface antigen and antibodies to the human immunodeficiency virus. The study protocols were reviewed and approved by the appropriate institutional review boards, and all subjects gave written informed consent to participate in the study.

Laboratory Testing. Antibodies to HCV were measured in serum samples via second-generation enzyme immunoassay (EIA-2; Abbott Laboratories, North Chicago, IL). EIA-2 reactive samples were subsequently tested via third-generation recombinant immunoblot assay (RIBA-3; Chiron Corp., Emeryville, CA). Reactivity to at least two of four HCV antigens (5-1-1/C100-3, C33, C22, and NS5) was considered a positive RIBA-3 result, no reactivity was considered a negative result, and reactiv-

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of Patients With HCV Infection

Characteristics	All (N = 48)	Chronic (n = 39)	Recovered (n = 9)	P Value
Mean age, yrs (range)	51 (33-83)	52 (37-83)	49 (33-78)	.46
Male, n (%)	23 (48)	17 (44)	6 (67)	.28
Race, n (%)				
White	43 (90)	35 (90)	8 (89)	1.00
Black	5 (10)	4 (10)	1 (11)	
Source of infection, n (%)				
Transfusion	16 (33)	14 (36)	2 (22)	.30
Injection drug use	19 (40)	15 (38)	4 (44)	
Nasal cocaine use	4 (8)	2 (5)	2 (22)	
Occupational	6 (13)	6 (15)	0 (0)	
Unknown	3 (6)	2 (5)	1 (11)	
Genotype, n (%)				
1	25 (52)	24 (62)	1 (11)	.074
2	7 (15)	6 (15)	1 (11)	
3	2 (4)	1 (3)	1 (11)	
Unknown	14 (29)	8 (21)	6 (67)	
Mean values (range)				
ALT (IU/L)	52 (15-251)	58 (28-251)	25 (15-52)	.001
AST (IU/L)	43 (12-145)	48 (12-145)	24 (13-37)	.001
ALP (IU/L)	69 (32-171)	71 (35-171)	59 (32-74)	.20
Total bilirubin (mg/dL)	0.7 (0.3-1.5)	0.7 (0.3-1.5)	0.7 (0.4-1.4)	.72
Albumin (g/dL)	3.9 (3.3-4.5)	3.9 (3.3-4.5)	4.0 (3.6-4.3)	.53
GGTP (g/dL)	44 (8-286)	48 (8-286)	27 (8-102)	.025
HCV RNA level (10 ⁵ IU/mL)	11.2 (<0.5-73)	14.1 (<0.5-73)	ND	<.001
Recombinant strip immunoblot assay				
C100	3.0 (0-4)	3.2 (0-4)	2.1 (0-4)	.042
C33	3.5 (1-4)	3.7 (1-4)	2.6 (1-4)	.011
C22	3.8 (0-4)	3.9 (1-4)	3.1 (0-4)	.068
NS5	2.1 (0-4)	2.3 (0-4)	1.3 (0-4)	.18

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; GGTP, γ -glutamyltransferase; ND, below the limits of detection.

ity to only one antigen was considered an indeterminate result. The serum levels of HCV RNA were determined using the qualitative and quantitative COBAS AMPLICOR assays (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ), which amplify HCV RNA via reverse-transcription polymerase chain reaction. HCV genotypes were determined using INNO-LiPA HCV II (Innogenetics, Gent, Belgium). Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and other relevant biochemical tests were performed using standard methods.

PBMCs. PBMCs were isolated from whole blood using cellular preparation tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), washed one time in phosphate-buffered saline (PBS) and three times in medium (RPMI 1640 medium supplemented with 2 mmol/L L-glutamine, 5×10^{-5} mol/L 2 mercaptoethanol, 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, and 10% fetal bovine serum), and were either studied immediately or cryopreserved in media containing 50% fetal bovine serum, 10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 10% RPMI 1640.

HCV Proteins. The recombinant full-length HCV core protein (amino acid residues 1-191), E2 protein

(amino acid residues 384-746), NS3 protein (amino acid residues 1027-1657), and NS5B protein (amino acid residues 2421-3011) were expressed and purified from *Escherichia coli* using the expression vector as previously described.^{22,23} Control proteins were expressed as carboxy-terminal fusion proteins with human superoxide dismutase in *E. coli*.

ELISpot Assay. Ninety-six-well plates containing high-protein binding membranes (MAIP S4510; Millipore Co., Bedford, MA) were coated with a 10- μ g/mL purified recombinant HCV core, E2, NS3, NS5b, or control antigens in carbonate coating buffer (0.1 mol/L Na₂CO₃, 0.1 mol/L NaHCO₃; pH 9.6). After incubation at 4°C overnight, the plates were washed twice with PBS and blocked with 3% bovine serum albumin for more than 30 minutes at 37°C. Cryopreserved PBMCs were thawed and incubated for 44 hours at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 1.25 \times 10⁵ or 2.5 \times 10⁵ cells/well in AIM V Media (Invitrogen, Carlsbad, CA). All determinations were run in triplicate. After incubation, the cells were removed by washing 6 times with PBS containing 0.05% NP-40, and the plates incubated with horseradish peroxidase-linked anti-human IgG or IgM antibodies (1:1,000; KPL, Gaithersburg, MD) at 37°C for 2 hours. After the plates were washed twice with PBS and 6 times with PBS containing 0.05% NP-40, an optimal 4CN peroxidase substrate (Bio-Rad, Hercules, CA) was added and incubated for 20 to 30 minutes at room temperature to develop the spots. The reaction was stopped by washing with distilled water. The plates were dried overnight, and the spots were counted automatically by an ELISPOT reader (Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos, Germany). The frequencies of anti-HCV antibody-secreting B cells were calculated by subtracting the mean number of spots in the control wells from the HCV antigen-coated wells, and expressed as the mean of triplicates of spot-forming cells (SFCs) per 10⁶ PBMCs. Assays with a high background (>5 spots/well in the negative control) were excluded.

Assay of Anti-HCV/NS3 Antibodies. Anti-HCV/NS3 IgG was assayed via ELISA as described previously.²³ Briefly, MaxiSorp Nunc-Immuno plates were coated with recombinant HCV NS3 protein at 6 μ g/mL in coating buffer (20 mmol/L sodium bicarbonate buffer [pH 9.6], 0.15 mol/L NaCl) and overcoated with 0.1% bovine serum albumin in PBS buffer (pH 7.4). The sera were tested via two-fold serial dilution in 0.3% IGEPAL CA-630 (Sigma), 5% milk diluent (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), and PBS [pH 7.4], with initial dilution at 1:250. Biotinylated anti-human IgG γ (Kirkegaard & Perry Laboratories) and streptavidin-horseradish peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratories)

were added sequentially. One hundred microliters per well ABTS microwell peroxidase substrate was used to develop the color and 100 μ L per well peroxidase stop solution (Kirkegaard & Perry Laboratories) was added to stop the reaction. Absorbance was read at 405 nm. The IgG titer was determined via end point dilution.

Statistical Analysis. The Mann-Whitney *U* test or Student *t* test was used to analyze continuous variables as appropriate. Spearman's rank order correlations were used to evaluate the frequencies of anti-HCV antibody-secreting B cells to each antigen and to the clinical features. A *P* value of .05 or less was considered significant. Although SFCs/10⁶ PBMCs were expressed in this study, the statistics were significant whether this was used or the raw counts were used. Statistical analyses were performed using SigmaStat (version 2.03; SPSS, Chicago, IL). Receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis was performed using MedCalc 7.0 software (<http://www.medcalc.be>). The best cutoff values of the ELISpot assays were chosen automatically by MedCalc 7.0 as the SFCs with the highest diagnostic accuracy (*i.e.*, the sum of the false-negative and false-positive rates was minimized). The respective overall diagnostic values were expressed using the area under the curve (AUC).

Results

Optimal Cutoff Values for ELISPOT Assay. To determine the optimal cutoff values for the B-cell ELISpot assay in differentiating patients with HCV infection from HCV seronegative blood donors, ROC curve analysis was performed. The ROC curves for the ELISpot assay detecting anti-HCV IgG-specific B cells were obtained via calculations made using the values obtained from 48 patients with HCV infection and the 11 HCV-negative volunteer blood donors. The selection of the optimal cutoff point value was based on the level at which the accuracy was maximum (see Patients and Methods). The optimal cutoff values, sensitivity, specificity, positive predictive values, negative predictive values, and calculated AUCs to all HCV antigens are listed in Table 2. In our ELISpot assay, the values of sensitivity ranged from 58% to 92%, and the values of specificity were 100%. The AUC results were constantly high in the ELISpot assays for all antigens, and AUC values were between 0.71 (NS5B antigen) and 0.94 (core and E2 antigens).

After we defined the optimal cutoff value for each antigen, we determined the frequencies of anti-HCV IgG-secreting B cells in 48 patients with HCV infection. The prevalence of anti-HCV IgG-secreting B cells during HCV infection specific for the various antigens were:

Table 2. Optimal Cutoff Values, Sensitivity, Specificity, AUC, and Predictive Values of Anti-HCV IgG-Secreting B Cells in ELISpot Assay in 48 Patients With Chronic Hepatitis C and 11 Volunteer Blood Donors

Antigen	Cutoff Value	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	AUC (95% CI)	PPV, %	NPV, %
Core	13.4	92 (80-98)	100 (71-100)	0.94 (0.84-0.98)	100	73
E2	10.7	92 (80-98)	100 (71-100)	0.94 (0.85-0.99)	100	73
NS3	5.4	77 (63-88)	100 (71-100)	0.83 (0.71-0.92)	100	50
NS5B	5.4	58 (43-72)	100 (71-100)	0.71 (0.58-0.82)	100	36

NOTE. All AUC values were significantly higher than a 0.50 nonpredictive value ($P < .001$ for all comparisons).

Cutoff values were determined by making ROC curves and are expressed as SFCs/ 10^6 PBMCs.

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

core, 92%; E2, 92%; NS3, 77%; and NS5B, 58% (Table 2).

We further assessed the optimal cutoff values for the ELISPOT assay detecting anti-HCV IgM-secreting B cells using ROC curve analysis in 43 patients with HCV infection and in 6 HCV-negative blood donors (Table 3). The AUC values ranged from 0.73 (NS5B antigen) to 0.94 (core antigen). The prevalence of anti-HCV IgM-secreting B cells ranged from 54% (NS5B antigen) to 84% (core antigen) (Table 3).

Detection and Quantitation of Anti-HCV Antibody-Secreting B Cells. Forty-eight PBMC samples obtained from patients with HCV infection and 11 samples from healthy volunteer blood donors were examined for detection of anti-HCV IgG-secreting B cells. The median numbers of the sum of anti-HCV IgG-secreting B cells to all HCV antigens were significantly higher in patients with HCV infection (38.3 SFCs/ 10^6 PBMCs; interquartile range [IQR], 10.7-149.3) compared with control anti-HCV negative donors (5.3 SFCs/ 10^6 PBMCs; IQR, 2.7-8.0; $P < .001$). Figure 1A shows box plots for the numbers of anti-HCV IgG-secreting B cells to all 4 HCV antigens in patients with HCV infection and in the controls. Among 48 patients with HCV infection, the median numbers of anti-HCV IgG-secreting B cells ranged from 10.7 SFCs/ 10^6 PBMCs (NS5B antigen) to 119.0 SFCs/ 10^6 PBMCs (E2 antigen). The median numbers of anti-HCV IgG-secreting B cells in patients with HCV infection were significantly higher than those in controls for each HCV antigen (Fig. 1A).

Subsequently, we developed an ELISpot assay for detecting anti-HCV IgM-secreting B cells. Detection of the anti-HCV IgM-secreting B cells was performed in 43 patients with HCV infection and in 6 anti-HCV negative blood donors (Fig. 1B). The median numbers of the sum of anti-HCV IgM-secreting B cells to all HCV antigens were significantly higher in patients with HCV infection (21.3 SFCs/ 10^6 PBMCs; IQR, 9.2-48.0) compared with the controls (8.0 SFCs/ 10^6 PBMCs; IQR, 0.0-10.7; $P < .001$). The median numbers of anti-HCV IgM-secreting B SFC to the core (31.1 vs. 4.0 SFCs/ 10^6 PBMCs; $P < .001$) and E2 (32.0 vs. 8.0 SFCs/ 10^6 PBMCs; $P = .005$) antigens in patients with HCV infection were significantly higher than those in controls. (Fig. 1B).

Relationship Between Anti-HCV Antibody-Specific B Cells and HCV Genotypes. Because the antigens used were derived from HCV genotype 1a, the numbers of anti-HCV IgG-secreting B cells were compared between 25 patients with HCV genotype 1 infection (10 with 1a, 11 with 1b, and 4 not subtyped) and 9 infected with another single genotype (1 with 2a, 4 with 2b, 2 with 2 untyped, and 2 with 3a). The median value of the anti-HCV IgG-secreting B cells to each antigen was not statistically different between the genotype 1 group and the other genotype groups (Fig. 2). In addition, there were no statistically significant differences in detecting anti-HCV IgM-secreting B cells to all HCV antigens in those with genotype 1 versus non-1 infections (data not shown).

Table 3. Optimal Cutoff Values, Sensitivity, Specificity, AUC, and Predictive Values of Anti-HCV IgM-Secreting B Cells in ELISpot Assay in 43 Patients With Chronic Hepatitis C and 6 Volunteer Blood Donors

Antigen	Cutoff Value	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	AUC (95% CI)	PPV, %	NPV, %
Core	12.1	84 (69-93)	100 (54-100)	0.94 (0.84-0.99)	100	46
E2	17.4	72 (56-85)	100 (54-100)	0.86 (0.73-0.94)	100	33
NS3	10.7	70 (54-83)	100 (54-100)	0.74 (0.60-0.86)	100	32
NS5B	8.1	54 (38-69)	100 (54-100)	0.73 (0.58-0.85)	100	23

NOTE. All AUC values were significantly higher than a 0.500 nonpredictive value ($P < .001$ for all comparisons). Cutoff values were determined by making ROC curves and are expressed as SFCs/ 10^6 PBMCs.

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

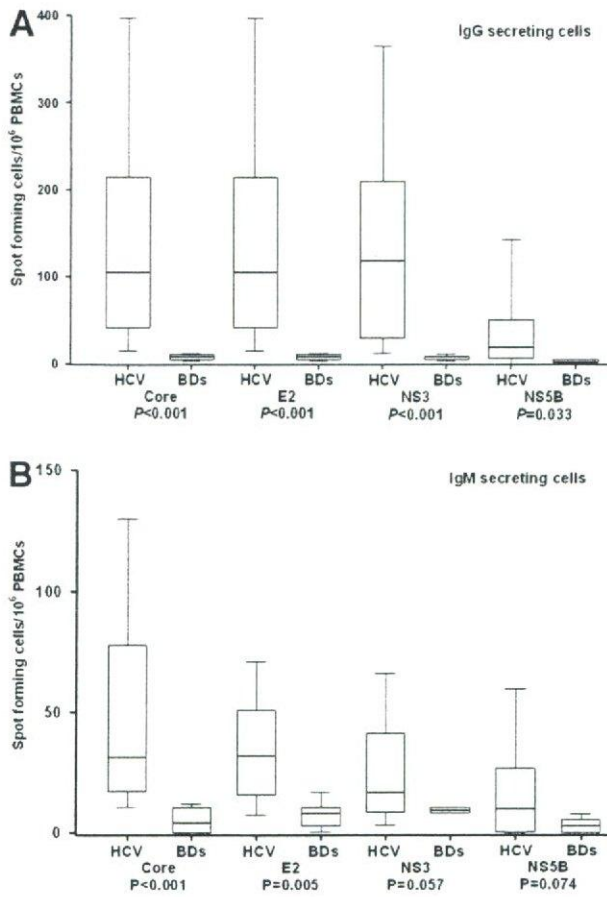


Fig. 1. Detection of anti-HCV antibody-secreting B cells in patients with HCV infection and volunteer blood donors. Boxes represent the IQR of the data. The lines across the boxes indicate the median values. The hash marks above and below the boxes indicate the 90th and 10th percentiles for each group, respectively. (A) The frequencies of anti-HCV IgG-secreting B cells to 4 HCV antigens were detected in 48 patients with HCV infection and in 11 volunteer blood donors. (B) The frequencies of anti-HCV IgM-secreting B cells were detected in 43 patients with HCV infection and in 6 volunteer blood donors. PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; IgG, immunoglobulin G; HCV, hepatitis C virus; BDs, blood donors; IgM, immunoglobulin M.

Correlation Between Anti-HCV IgG-Secreting B Cells and Clinical Features in Patients With HCV Infection. Several demographic (age and sex) and clinical (viral load, genotype, ALT, AST, alkaline phosphatase, total bilirubin, albumin, γ -glutamyltransferase, intensity of RIBA assay, and anti-HCV antibodies) findings were examined for their correlation with anti-HCV IgG-secreting B-cell frequency in patients with HCV infection. The circulating anti-HCV IgG-secreting B-cell frequency to the core antigen (Fig. 3A) was significantly correlated with the value of ALT ($P = .048, r = 0.29$) and inversely correlated with serum albumin ($P = .048, r = -0.33$). Similarly, the number of anti-HCV IgG-secreting B cells to the E2 antigen was significantly correlated with the

value of ALT ($P = .037, r = 0.30$) (Fig. 3B) and AST ($P = .033, r = 0.31$) (Fig. 3C) and was inversely correlated with serum albumin ($P = .029, r = -0.36$). Furthermore, the number of SFCs to the NS3 antigen was significantly correlated with the circulating antibody level to the NS3 antigen in 38 patients with available serum samples ($P = .008, r = 0.43$) (Fig. 3D). There was no significant correlation between the numbers of anti-HCV IgG-secreting B cells to NS3 or NS5b antigens and any of the biochemical, demographic, or clinical parameters specified above.

Comparison of the Number of Anti-HCV Antibody-Secreting B Cells Between Patients With Chronic Hepatitis C and Patients Who Recovered. As shown in Table 1, patients with chronic hepatitis C had significantly higher mean serum levels of ALT (58 vs. 25 IU/L; $P = .001$), AST (48 vs. 24 IU/L; $P = .001$), and γ -glutamyltransferase (48 vs. 27 IU/L; $P = .025$) compared with the recovered patients. The mean HCV RNA level in the chronic group was 14.1×10^5 IU/mL. There were significant differences in the mean intensity of the RIBA assay against the C33 and C100 proteins in chronic vs. recovered subjects (C33, 3.2 vs. 2.1, $P = .042$; C100, 3.7 vs. 2.6, $P = .011$). We found no significant difference between patients with chronic hepatitis C and patients who had recovered when their age, sex, race, source of infection, HCV genotypes, total bilirubin, or albumin were compared.

The median numbers of the sum of anti-HCV IgG-secreting B cells to all HCV antigens were significantly higher in patients with chronic hepatitis C (47.3 SFCs/

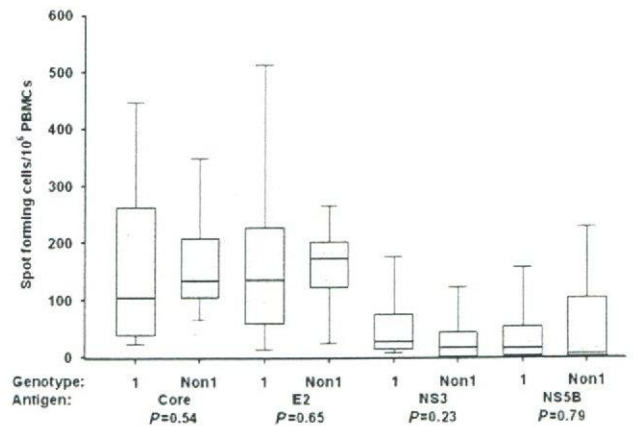


Fig. 2. Detection of anti-HCV IgG-secreting B cells in patients infected with HCV of genotype 1 and nongenotype 1. Boxes represent the IQR of the data. The lines across the boxes indicate the median values. The hash marks above and below the boxes indicate the 90th and 10th percentiles for each group, respectively. The frequencies of anti-HCV-secreting B cells were detected in patients infected with genotype 1 ($n = 25$) and in those with other genotypes ($n = 9$). PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; Non1, nongenotype 1.

10^6 PBMCs; IQR, 13.3-149.7) than in recovered patients (15.3 SFCs/ 10^6 PBMCs; IQR, 3.3-142.7; $P = .05$) and normal controls (5.3 SFCs/ 10^6 PBMCs; IQR, 2.7-8.0; $P < .001$). The median numbers of the sum of anti-IgG-

secreting B cells to structural antigens were not significantly higher in patients with chronic hepatitis C (108.3 SFCs/ 10^6 PBMCs) than in those who recovered (97.4 SFCs/ 10^6 PBMCs) (Fig. 4A). In contrast, the median numbers of the sum of anti-HCV IgG-secreting B cells to nonstructural antigens were significantly higher in patients with chronic hepatitis C (19.0 SFCs/ 10^6 PBMCs) than in patients who recovered (4.9 SFCs/ 10^6 PBMCs; $P = .018$), particularly for NS3 antigen (26.7 vs. 5.3 SFCs/ 10^6 PBMCs; $P = .032$) (Fig. 4B). Furthermore, patients with chronic hepatitis C had a significantly higher frequency of anti-HCV IgG-secreting B cells to the NS3 antigen than those who recovered (85% vs. 44%; $P = .02$) (Fig. 4C).

The median numbers of the sum of anti-HCV IgM-secreting B cells to all HCV antigens were similar in patients with chronic hepatitis C (22.0 SFCs/ 10^6 PBMCs; IQR, 8.2-49.3) and recovered patients (20.7 SFCs/ 10^6 PBMCs; IQR, 12.2-36.7) and were significantly higher than in the controls (8.0 SFCs/ 10^6 PBMCs; IQR, 0.0-10.7; $P < .001$) (Fig. 4A). When the responses were analyzed for structural and nonstructural antigens, the median numbers of the sum of anti-HCV IgM-secreting B cells were not significantly different in patients with chronic hepatitis C and recovered subjects for either structural antigens (30.7 vs. 31.6 SFCs/ 10^6 PBMCs) or nonstructural antigens (20.7 vs. 12.7 SFCs/ 10^6 PBMCs) (Fig. 4A).

Discussion

We developed an ELISpot assay for sensitive quantitative assessment of anti-HCV antibody-secreting B cells in PBMCs from patients with HCV infection and used this technique to analyze the induction of humoral immune responses at the single-cell level. IgG and IgM anti-HCV antibody secreting B cells to core, E2, NS3, and NS5 were detected and quantified in patients with chronic HCV infection and compared with recovered patients and uninfected controls. The key findings were: (1) anti-HCV secreting B-cell responses were greater in chronically infected patients than in recovered patients, suggesting that antibody does not play a major role in recovery from acute

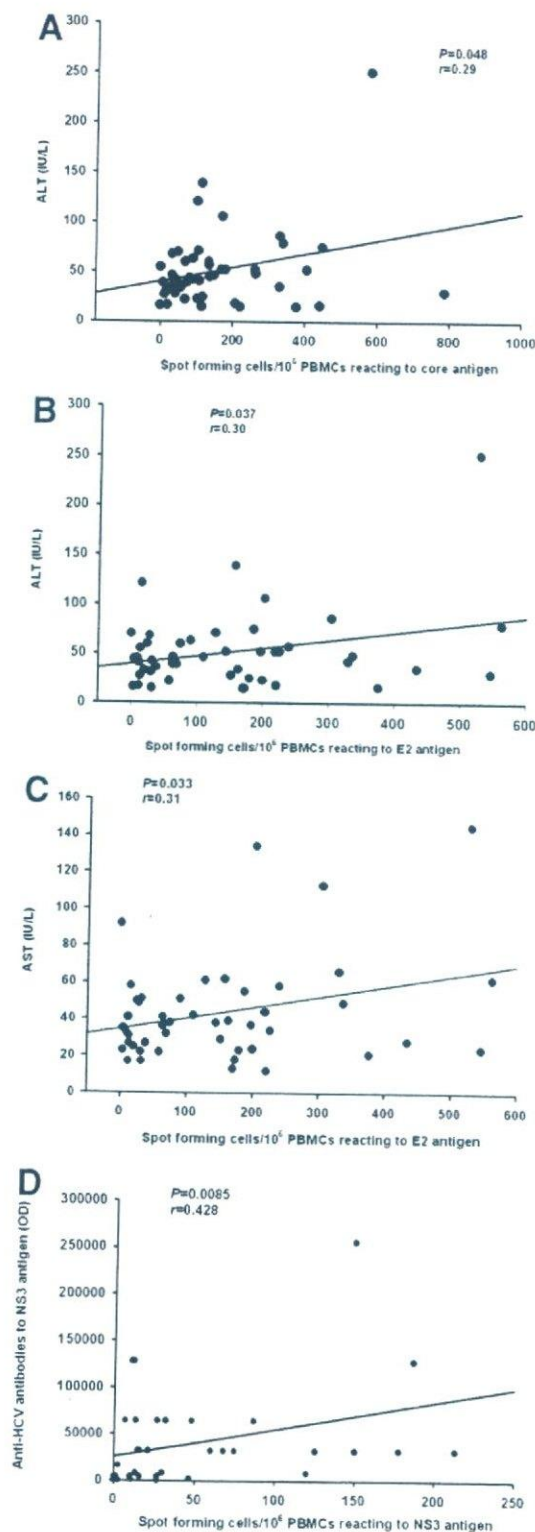


Fig. 3. Correlation of the number of anti-HCV IgG-secreting B cells and clinical characteristics in 48 patients with HCV infection. (A) Frequency of circulating anti-HCV IgG-secreting B cells to core antigen was significantly correlated with the value of ALT ($r = 0.29$, $P = .048$). (B-C) Frequency of circulating anti-HCV IgG-secreting to E2 antigen was correlated with the value of (B) ALT ($r = 0.30$, $P = .037$) and (C) AST ($r = 0.31$, $P = .033$), respectively. (D) Frequency of circulating anti-IgG-secreting B cells to NS3 antigen was correlated with the value of anti-HCV antibodies to NS3 antigen ($r = 0.43$, $P = .0085$). ALT, alanine aminotransferase; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; AST, aspartate aminotransferase; HCV, hepatitis C virus.

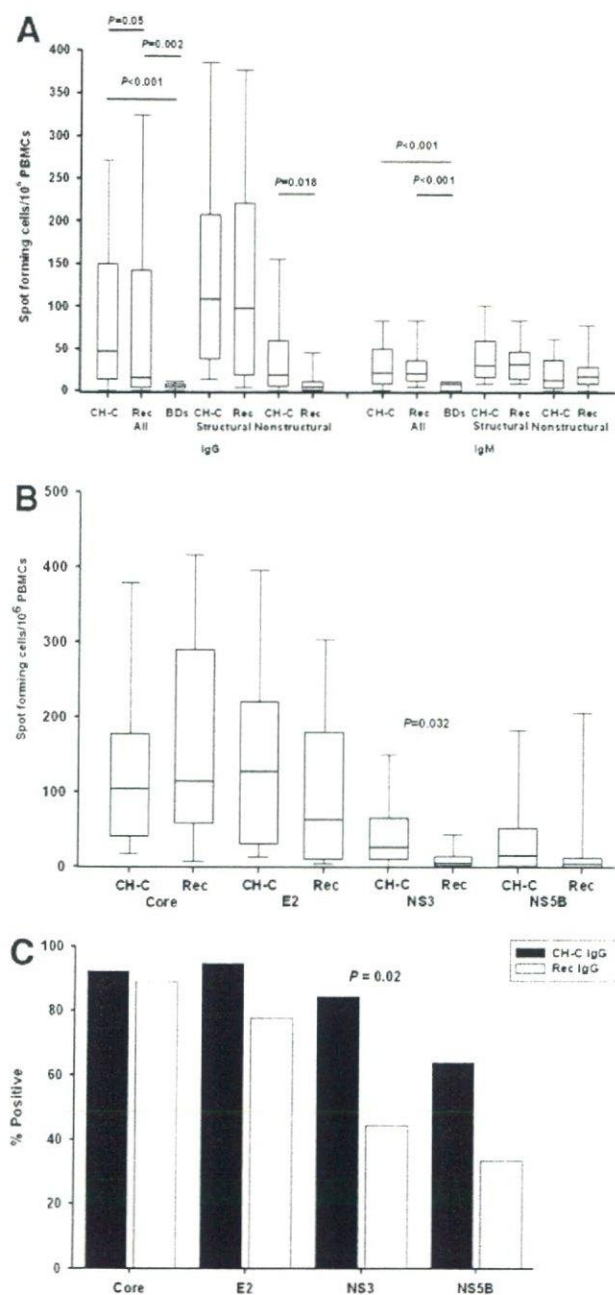


Fig. 4. Detection of anti-HCV antibody-secreting B cells in patients with chronic hepatitis C and in patients who had recovered from HCV. (A) Circulating anti-HCV IgG-secreting B cells were detected in 39 patients with chronic hepatitis C, 9 patients who had recovered from HCV infection, and 11 volunteer blood donors. Circulating anti-HCV IgM-secreting B cells were detected in 34 patients with chronic hepatitis C, 9 patients who had recovered from HCV infection, and 6 volunteer blood donors. (B) Frequency of circulating anti-HCV IgG-secreting B cells to 4 HCV antigens were detected in 39 patients with chronic hepatitis C and in 9 recovered patients. (C) The prevalence of anti-HCV IgG-secreting B cells in 39 patients with chronic hepatitis C and 9 recovered patients. PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; CH-C, chronic hepatitis C; BDs, blood donors; Rec, recovered; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M.

HCV infection, as also indicated by recently developed pseudotype assays for HCV-neutralizing antibodies^{24,25}; (2) the primary difference between chronically infected and recovered subjects was in the greater reactivity of the former to nonstructural antigens; (3) in chronic infection, HCV antibodies were cross-reactive against genotypes, again consistent with recent findings by neutralizing antibody assays^{26,27}; (4) the ELISpot assay can measure IgM as well as IgG responses at the single-cell level, providing a new means to measure the more elusive IgM response; (5) IgM responses were surprisingly well maintained during chronic infection; and (6) IgG responses correlated positively with serum transaminase levels.

In this study, the B-cell ELISpot assay showed high specificity (91% to 100%) and sensitivity (58% to 92%) to all HCV antigens through analysis of the ROC curves and thus achieved high diagnostic accuracy. Although there was a general problem that raw numbers of SFCs were low, statistical analysis and prior publications^{28,29} suggest that these small differences are consistent and relevant. Of note, individuals infected with nongenotype 1 variants were strongly positive in this assay, which used only genotype 1-derived antigens. This suggests that genotype 1 contains conserved epitopes that will allow the ELISpot assay to assess humoral immune responses to HCV irrespective of genotype (Fig. 2), with the caveat that we did not assess genotypes 4, 5, and 6, all of which are rare in the United States.

ELISpot assay has been used as a sensitive and specific tool to measure B-cell responses in autoimmune diseases^{28,29} and viral infections such as cytomegalovirus,¹⁵ rotavirus,¹⁶ measles virus,¹⁷ and hepatitis B virus,^{18,19} as well as to evaluate responses to bacterial³⁰ and viral vaccines.^{18,19} Other reports demonstrate that ELISpot is able to detect and numerate antigen-specific memory B cells in PBMCs after *in vitro* stimulation in both autoimmune diseases and viral infection.^{31,32} Thus, the B-cell ELISpot assay might be a useful tool to detect anti-HCV-specific memory B cells, and to monitor the efficacy of future HCV vaccines.

Interestingly, this study showed a strong correlation between the numbers of anti-HCV IgG-secreting B cells to the core and E2 antigens and the values of serum transaminases. The clinical significance of these observations is unknown, but raises the possibility that antibodies can contribute to liver cell injury. In addition, Ni et al.³³ recently reported that 10 of 36 hepatitis C patient samples showed increased B-cell frequencies that correlated with the degree of hepatic fibrosis. There are insufficient histological data in our study to assess whether the numbers of anti-HCV antibody-secreting B cells correlate with the degree of fibrosis as well as biochemical evidence of inflammation.

The median numbers of the sum of anti-HCV IgG-secreting B cells to nonstructural antigens were significantly higher in patients with chronic hepatitis C than in recovered patients. Similarly, an HCV-specific B-cell response was more frequently detected in patients with chronic hepatitis C than in recovered subjects (92% vs. 56%; $P = .017$) and was directed against a broader range of HCV antigens, particularly to NS3. In contrast, CD4 T-cell responses to NS3 epitopes are greatest in patients who recover from HCV infection.^{34,35}

We have also developed and evaluated the ELISpot assay for detecting anti-HCV IgM-secreting B cells. It has been reported that IgM anti-HCV in serum might be predictive of viral clearance in acute hepatitis C or response to interferon therapy.³⁶⁻⁴⁰ However, these results have been controversial and other studies have shown a significant correlation between IgM anti-HCV levels in serum and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation.^{41,42} In this study, we found that IgM-secreting B cells persisted during chronic infection so that the usefulness of IgM detection for assessing acute versus chronic HCV infection would have to depend on quantitative differences in IgM level rather than the simple presence or absence of IgM antibody. The fact that there are no standardized assays for measuring IgM anti-HCV in serum and the ready detection of IgM-secreting B cells in this study suggests that the ELISpot assay could be used to better define the clinical relevance of IgM antibody in acute and chronic HCV infection.

Overall, this study, as do studies of HCV-specific neutralizing antibodies,^{26,27} suggest that the humoral arm of the HCV immune response is not a critical element of spontaneous viral clearance. However, because of the difficulty in obtaining serial acute-phase PBMC collections from recovering subjects, our study does not exclude a role for antibody-mediated viral clearance early in HCV infection. Sequential acute phase ELISpot IgM testing of PBMCs is planned in forthcoming chimpanzee infectivity studies. Nonetheless, studies of neutralizing and anti-envelope antibodies that measured serial acute phase serum samples from recovering subjects^{26,27} did not show that such antibodies correlated with viral clearance. Rather, it appears in those studies and the current study that antibodies to HCV increase in strength and broadness of reactivity during the course of chronic infection, presumably because of persistent antigenic stimulation. This is in contrast to cell-mediated immunity that is markedly diminished in chronically infected compared with recovered subjects. This dichotomy between the humoral and cellular immune response to HCV is intriguing and suggests T-cell tolerance in the absence of B-cell tolerance.

It is interesting to speculate on the role that antibodies might play in HCV infection. First, it seems reasonable that such antibodies complexed to virus would reduce the level of free virus and diminish transmission to others. This reduction in free virus in addition to lowered viral load might explain the relative rarity of sexual and perinatal transmission during chronic HCV infection. More intriguing is whether such antibodies establish the set point for viral load during chronic infection. It is known that viral loads are highest early in HCV infection prior to the appearance of antibody⁴³ and that chronically infected patients establish a lower and relatively constant level of viremia.⁴⁴ It appears that production and elimination of virus achieve a steady state. This steady state is probably multifactorial in origin, but antibody may play a key role. When patients in a steady state are immunosuppressed at the time of transplantation⁴⁵ or when coinfecting with human immunodeficiency virus,⁴⁶ the viral load increases, supporting an immunological role for viral containment even in the absence of clearance. A deleterious function of anti-HCV is that it serves to drive quasi-species evolution making it increasingly hard for the immune system to achieve viral clearance. Farci et al.⁴⁷ have shown in both humans and chimpanzees that the appearance of antibody coincides with increasing viral diversity and complexity and predicts progression to chronic infection.

In conclusion, there is much to explore regarding the function and relevance of IgG and IgM antibodies in HCV infection, and we believe the ELISpot assay, by measuring antibody production at the single-cell level, provides a new and useful tool for understanding the complex interplay between HCV and the host immune response.

References

1. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo Q-L, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
2. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *HEPATOLOGY* 1990;12:671-675.
3. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20:17-35.
4. Beld M, Penning M, van Putten M, Lukashov V, van den Hoek A, McMorrow M, et al. Quantitative antibody responses to structural (Core) and nonstructural (NS3, NS4, and NS5) hepatitis C virus proteins among seroconverting injecting drug users: impact of epitope variation and relationship to detection of HCV RNA in blood. *HEPATOLOGY* 1999;29:1288-1298.
5. Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1999;116:135-143.
6. Baumert TF, Wellnitz S, Aono S, Sato J, Herion D, Tilman Gerlach J, et al. Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *HEPATOLOGY* 2000;32:610-617.

7. Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000;6:578-582.
8. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999;10:439-449.
9. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-1512.
10. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-1406.
11. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 2003;302:659-662.
12. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;65:109-121.
13. Sedgwick JD, Holt PG. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;57:301-309.
14. Arvilommi H. ELISPOT for detecting antibody-secreting cells in response to infections and vaccination. *APMIS* 1996;104:401-410.
15. Besancon-Watelet C, De March AK, Renoult E, Kessler M, Bene MC, Faure GC, et al. Early increase of peripheral B cell levels in kidney transplant recipients with CMV infection or reactivation. *Transplantation* 2000;69:366-371.
16. Brown KA, Kriss JA, Moser CA, Wenner WJ, Offit PA. Circulating rotavirus-specific antibody-secreting cells (ASCs) predict the presence of rotavirus-specific ASCs in the human small intestinal lamina propria. *J Infect Dis* 2000;182:1039-1043.
17. Niewiesk S, Gotzelmann M, ter Meulen V. Selective in vivo suppression of T lymphocyte responses in experimental measles virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4251-4255.
18. Rahman F, Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Cellular and humoral immune responses induced by intradermal or intramuscular vaccination with the major hepatitis B surface antigen. *HEPATOLOGY* 2000;31:521-527.
19. Bauer T, Weinberger K, Jilg W. Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals. *HEPATOLOGY* 2002;35:455-465.
20. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1996;334:1691-1696.
21. Alter HJ, Conry-Cantilena C, Melpolder J, Tan D, Van Raden M, Herion D, et al. Hepatitis C in asymptomatic blood donors. *HEPATOLOGY* 1997;26(Suppl):295-335.
22. Chen Z, Berkower I, Ching WM, Wang RYH, Alter HJ, Shih JWK. Identification of a murine CD4⁺ T-lymphocyte response site in hepatitis C virus core protein. *Mol Immunol* 1996;33:703-709.
23. Jiao X, Wang RYH, Qiu Q, Alter HJ, Shih JWK. Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. *J Gen Virol* 2004;85:1545-1553.
24. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudoparticles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-642.
25. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7271-7276.
26. Bartosch B, Bukh J, Meunier JC, Granier C, Engle RE, Blackwelder WC, et al. In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14199-14204.
27. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, et al. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10149-10154.
28. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y. Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is useful in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med* 2003;114:322-325.
29. Kajihara M, Kato S, Okazaki Y, Kawakami Y, Ishii H, Ikeda Y, et al. A role of autoantibody-mediated platelet destruction in thrombocytopenia in patients with cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2003;37:1267-1276.
30. Mattsson A, Lonroth H, Quiding-Jarbrink M, Svennerholm AM. Induction of B cell responses in the stomach of *Helicobacter pylori*-infected subjects after oral cholera vaccination. *J Clin Invest* 1998;102:51-56.
31. Slifka MK, Ahmed R. Limiting dilution analysis of virus-specific memory B cells by an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 1996;199:37-46.
32. Corcoran A, Mahon BP, Doyle S. B cell memory is directed toward conformational epitopes of parvovirus B19 capsid proteins and the unique region of VP1. *J Infect Dis* 2004;189:1873-1880.
33. Ni J, Hembrador E, Di Bisceglie AM, Jacobson IM, Talal AH, Butera D, et al. Accumulation of B lymphocytes with a naive, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J Immunol* 2003;170:3429-3439.
34. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, et al. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995;346:1006-1007.
35. Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4⁺ and CD8⁺ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *HEPATOLOGY* 2003;37:577-589.
36. Chen PJ, Wang JT, Hwang LH, Yang YH, Hsieh CL, Kao JH, et al. Transient immunoglobulin M antibody response to hepatitis C virus capsid antigen in posttransfusion hepatitis C: putative serological marker for acute viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5971-5975.
37. Lohr H, Nagel C, Dienes HP, Simpson B, Michel G, Goergen B, et al. Significance of IgG and IgM HCV antibody secretion in vitro in patients with chronic hepatitis C: correlation with disease activity and response to interferon-alpha. *HEPATOLOGY* 1994;20:1383-1389.
38. Yuki N, Hayashi N, Ohkawa K, Hagiwara H, Oshita M, Katayama K, et al. The significance of immunoglobulin M antibody response to hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C. *HEPATOLOGY* 1995;22:402-406.
39. Quiroga JA, van Binsbergen J, Wang CY, Pardo M, Navas S, Trines C, et al. Immunoglobulin M antibody to hepatitis C virus core antigen: correlations with viral replication, histological activity, and liver disease outcome. *HEPATOLOGY* 1995;22:1635-1640.
40. Pawlowsky JM, Roudot-Thoraval F, Bastie A, Darthuy F, Remire J, Metreau JM, et al. Factors affecting treatment responses to interferon-alpha in chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 1996;174:1-7.
41. Crespo J, Carte B, Lozano JL, Casafont F, Rivero M, de la Cruz F, et al. Hepatitis C virus recurrence after liver transplantation: relationship to anti-HCV core IgM, genotype, and level of viremia. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1458-1462.
42. Bizollon T, Ahmed SN, Guichard S, Chevallier P, Adham M, Ducerf C, et al. Anti-hepatitis C virus core IgM antibodies correlate with hepatitis C recurrence and its severity in liver transplant patients. *Gut* 2000;47:698-702.
43. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *HEPATOLOGY* 2002;36(Suppl 1):S21-S29.
44. Yeo AE, Ghany M, Conry-Cantilena C, Melpolder JC, Kleiner DE, Shih JW, et al. Stability of HCV-RNA level and its lack of correlation with disease severity in asymptomatic chronic hepatitis C virus carriers. *J Viral Hepat* 2001;8:256-263.
45. Gane E. The natural history and outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-infected recipients. *Liver Transpl* 2003;9:S28-S34.
46. Thomas DL, Astemborski J, Vlahov D, Strathdee SA, Ray SC, Nelson KE, et al. Determinants of the quantity of hepatitis C virus RNA. *J Infect Dis* 2000;181:844-851.
47. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000;288:339-344.

C型慢性肝炎治療の進歩

信州大学 消化器内科
清澤研道

はじめに

C型肝炎は日本において負の遺産として認識され、大きな社会的な問題の一つとして考えられている。フィブリノゲン製剤によるC型肝炎の発生は訴訟となっており、フィブリノゲン製剤が使用された医療機関が公表された。一方、明らかにC型肝炎に起因する肝細胞癌患者は増加の一途にあり年間約33000人が死亡している¹⁾。C型慢性肝炎は長期的にみると予後の悪い疾患であり、肝硬変・肝細胞癌へと進展することは知られた事実である。治療の基本は原因ウイルスであるC型肝炎ウイルス(HCV)の根絶にある。

日本肝臓学会が1999年に作成した肝がん白書は大きな反響を呼び、中に提言された肝細胞癌撲滅の施策は着実に実行に移されている²⁾。検診でのHCV抗体のスクリーニング、インターフェロン(IFN)とリバビリンの併用療法の導入などなどである。C型肝炎の抗ウイルス療法に関してはポリエチレングリコール(Polyethyleneglycol)付加IFN(PEG-IFN)の導入も進みC型肝炎の治療は新しい局面を迎えている。

C型肝炎に対する抗ウイルス療法の変遷

C型肝炎に対する抗ウイルス療法の変遷と治療効果の変化を表1に示した。

1992年から抗ウイルス療法としてインターフェロン(IFN)単独療法が保険診療で行なわれるようになったが、その有用性は極めて限られたものであった。特にわが国のC型肝炎の70%を占め、難治性といわれている遺伝子1b型(HCV1b型)のアンプリコアモニター法100KIU/ml以上、あるいは分岐DNA法1Meq/ml以上の高ウイルス量

表1 わが国におけるC型肝炎に対する抗ウイルス療法の変遷と治療効果

年	治療法	全体	HCV1b型 SVR	HCV2型 SVR
1992	インターフェロン単独24週	25%	5%	40%
2001	コンセンサスインターフェロン単独24週	30%	15%	50%
	インターフェロンα2b+リバビリン併用24週	35%	20%	60%
2002	インターフェロン単独投与期間制限撤廃、再投与			
2003	ペグインターフェロンα2a(180μg)単独48週	34%	17%	70%
2004	インターフェロンα2b+リバビリン併用48週	45%	45%	
	ペグインターフェロンα2b+リバビリン併用48週	48%	48%	

症例では著効率は5%前後という成績であった。

最近になり新しい抗ウイルス療法が行なわれるようになり治療成績が向上している。2001年12月からインターフェロンα2b(IFNα2b)とリバビリンの併用療法(24週)が可能となった。これによりHCV1b型・高ウイルス量症例で約20%の著効が得られるようになった。2002年2月からは難治症例に対してIFN単独長期治療(2年)が認められるようになった。2003年12月からは週1回注射の徐放型IFNであるペグインターフェロンα2a(PEG-IFNα2a)単独治療(ペガシス® 48週投与)が登場した。自覚症状は軽くなり生活上への負担は亡くなりQOLは向上した。一方で、血小板減少、好中球減少などの副作用は注意が必要である。

さらに直近のこととして、2004年12月からはペグインターフェロンα2b(PEG-IFNα2b)(ペグイントロン®)とリバビリンの併用(48週投与)が可能となった。この治療により著効率はHCV1b型で約50%に上昇した。今後はリバビリンが禁忌でない症例にはPEG-IFNα2bとリバビリンの併用療法がC型肝炎の治療の主流になると思われる。ただし、副作用は骨髄抑制、溶血性貧血など多彩であることから十分な管理の下におこなう

必要がある。さらに2005年4月からはペグインターフェロンを除くIFN α 製剤の自己注射が保険診療で可能となった。

このようにC型肝炎に対する抗ウイルス療法は進歩し治療法も多岐になったことにより、症例に合った治療法を行なえるようになってきている。一方でこれら治療でも著効の得られない場合の対策は今後の重要な課題である。

ペグインターフェロンとリバビリン

1) ペグインターフェロン (PEG-IFN)

PEG-IFNはポリエチレングリコール (Polyethyleneglycol:PEG) にインターフェロンを結合したものである。PEGは合成高分子ポリエチレングリコールであり、不揮発性、無臭、免疫原性・毒性がない物質である。これを蛋白(ペプチド)に結合させると、ペプチドの薬理作用を修飾する。具体的には体内で分解酵素の影響を少なくして長時間の薬効を得ることができ、ペプチドの抗原性を少なくすることができる。PEG-IFNの特徴として以下の点があげられる。第1は吸収がゆるやかである、第2は有効血中濃度を一定レベル以上に高く持続的に維持できる、第3は週1回の皮下注射でよく患者にとって頻回の通院を必要としない、などである。臨床現場で使用できるPEG-IFNにはPEG-IFN α 2a(ペガシス[®])とPEG-IFN α 2b(ペグイントロン[®])がある。両者の違いはポリエチレングリコールが2分子インターフェロンに結合したものがPEG-IFN α 2aであり、1分子結合したものがPEG-IFN α 2bである。両者の違い

表2 ペグインターフェロン

一般名 (商品名)	PEG-IFN α 2a	PEG-IFN α 2b
PEG重量	40 KD	12 KD
PEG連結方法	分岐型	一本鎖
半減期	77-100時間	30-60時間
抗ウイルス活性	7%	28%
規格	90 μ g/180 μ g	50/100/150 μ g
用法	Fix Dose (180 μ g)	体重により用量調節 (1.5 μ g/kg)

を表2に示した。投与中の血中濃度はPEG-IFN α 2aの方がPEG-IFN α 2bより高く維持される傾向がある。

2) リバビリン

リバビリン (Ribavirin, 1- β -D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide) はプリン体系核酸誘導体(核酸類似薬)であり幅広い抗ウイルス活性を有する。しかしC型肝炎にはリバビリン単独投与では抗ウイルス効果はなく、IFNとの併用ではじめて抗ウイルス効果が発揮される。リバビリンの作用機序は十分解析されていないが、免疫学的機序やHCV遺伝子変異の促進が考えられている。一方で、副作用として溶血による貧血が高率に認められる。組織(細胞)に取り込まれたリバビリンはリン酸化を受けるが、その後有核細胞では脱リン酸酵素により脱リン酸化され細胞外に放出される。赤血球では核がないため脱リン酸酵素が存在せずリバビリンが細胞内に蓄積し赤血球膜が障害を受け溶血を来すと説明されている。

PEG-IFN α 2a単独療法の適応

海外におけるPEG-IFN α 2a(市販名:ペガシス[®])単独の容量別試験から従来型IFN α 2a, 3~6MIU48週とPEG-IFN α 2a, 180 μ g48週投与24週観察後のSVRは各々19%(50/264), 39%(103/267)で後者に著明な有効性が報告されている^{3,4)}。本邦で行なわれた治験ではPEG-IFN α 2a, 48週投与でのSVRは高いがHCV1b型かつ高ウイルス量(アンプリコア500KIU/ml以上)のSVRは低かった。しかしHCV1b型かつアンプリコア500KIU/ml以下では37%のSVRを示した。またHCV2型では80%の高SVRを示した⁵⁾。

PEG-IFN α 2aの副作用については、感冒、発熱、頭痛など急性副作用は比較的軽いため生活する上での支障は従来型IFN α 2aよりは少ない。しかし、間質性肺炎、うつ病、脳出血、自己免疫疾患などには注意が必要である。また、血小板、白血球、好中球など血球減少は高頻度に出現するため定期的検査は欠かせず、必要に応じて減量・休薬・中止しなければならない。

後述するが、HCV1b型でHCV RNA高ウイル

量 (100LIU/ml 以上) の治療はリバビリンの併用が欠かせない状況になっている。このことから PEG-IFN α 2a 単独療法の適応は HCV 1b 型で HCV RNA 高ウイルス量以外の症例でリバビリンが使用できない場合や週 1 回注射による QOL を重視した治療には適している。

IFN α 2b とリバビリン併用療法

欧米における IFN α 2b とリバビリン併用療法の成績は 1998 年に報告され、IFN 単独療法では SVR が 24 週で 5.6%, 48 週で 12.9% であるが、併用療法の 24 週では 30.7%, 48 週では 38.2% であったと報告されている⁶⁾。

本邦における HCV 1b 型高ウイルス量に対する治療は飯野らにより行なわれた⁷⁾。投与方法は、IFN α 2b (市販名: イントロン A[®])、6 MU (I 群) または 10 MU (II 群) を連日 2 週間後、週 3 回 22 週の間歇投与を行ない、併用するリバビリンは、体重 60Kg 以下では 600mg/日、60Kg 以上では 800mg/日を朝 (200/400mg)・夕 (400/400mg) 連日というものであった。対照 (III 群) はイントロン A[®] 単独 24 週投与であった。SVR は I 群で 20.2% (18/89)、II 群で 17.4% (16/92) とほぼ同程度であった。III 群 (対照) では 2.3% (2/88) で IFN α 2b とリバビリン併用療法は有用性が確認され 2001 年 12 月に保険適応となった。適応は遺伝子型に関係なく高ウイルス量 (100KIU/ml, 1 Meq/ml 以上) 症例、あるいは 1 型の低ウイルス量症例である。残念ながら投与期間は 24 週が上限となっている。

難治性である HCV 1b 型・高ウイルス量症例ではリバビリン併用療法 24 週後にさらに IFN 単独療法を 24 週追加することにより SVR を上げることができ、実際 Hiramatsu らは 10% 上乗せできたと報告している⁸⁾。

先に述べた海外での IFN α 2b とリバビリン併用療法は最初から IFN α 2b、3 MU を週 3 回間歇投与/48 週が標準で、リバビリンは体重の違いから本邦使用の約 1.5 倍量となっている。24 週治療と 48 週治療の SVR は HCV 1 型で各々 16%, 28%, 1 型以外では各々 69%, 66% であり、1 型では有意な相違が見られたが 2 型では相違がない。この

ことから 1 型で 48 週治療がよく、1 型以外では 24 週で十分といえる。

信大消化器内科関連病院の保険診療による IFN α 2b とリバビリン併用療法の SVR は 1b 型 (n=73) で 22%, 2 型 (n=45) で 60% であり、報告されている成績と同等である。注意を要するのは副作用が多く、インターフェロン中止 14%・減量 12%, リバビリン中止 14%・減量 22% があるということである。主な副作用は食欲低下など消化器症状、うつ状態など精神症状、貧血・血球減少である。

PEG-IFN α 2b とリバビリン併用療法

PEG-IFN α 2b とリバビリン併用療法その他施設共同比較試験は Manns らにより行なわれ、PEG-IFN α 2b (1.5 μ g/kg) + リバビリン (800mg/日) 48 週併用投与の SVR 率は 48% と対照の従来型 IFN α 2b + リバビリン併用療法の 38% に比較し有意に効率であることが報告された⁹⁾。この結果を踏まえ、わが国においても、Phase III 試験が行なわれた¹⁰⁾。Study 1 の方法は [PEG-IFN α 2b (市販名: ペグイントロン[®])、1.5 μ g/kg/週/皮下注射 + リバビリン 600, 800 又は 1000mg/日・経口投与を 48 週投与] で 254 例に行なわれた。Study 2 の方法は [IFN α 2b (市販名: イントロン A[®])、6 MU/週 3 回/24 週とリバビリン 600, 800 又は 1000mg/日・経口投与を 24 週投与] で 209 例に行なわれた。両者の経時的な HCV RNA 陰性化率を表 3 に示した。最終的な SVR は Study 1 で 49.6% (121/244)、表 3 ペグインターフェロン α 2b + リバビリン併用 48 週治療とインターフェロン α 2b + リバビリン 24 週治療時の HCVRNA 陰性化率

経過(週)	Peg-IFN α 2b + Rib(48週)	IFN α 2b + Rib(24週)
	n=254	n=209
投与開始4週	8.20%	22.80%
投与開始12週	60.50%	67.50%
投与開始24週	74.80%	81.40%
投与開始36週	78.40%	
投与開始48週	72.50%	
投与終了後24週(SVR)	49.60%	22.10%
再燃率	33.50%	72.20%

Study 2で22.1% (45/204) で有意 (p<0.001) に前者が高率であった。(図1)その後さらに IFN α 2b とリバビリン併用療法48週との比較試験も行なわれた。それによると、PEG-IFN α 2b とリバビリン併用療法の SVR は47.6% (121/254), IFN α 2b とリバビリン併用では44.8% (113/252) であり改めてその有用性が確認された。

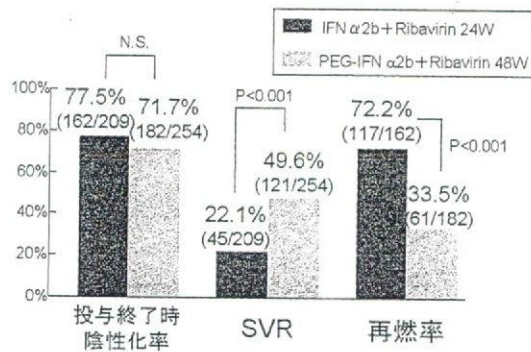


図1 HCV RNA 陰性化率および再燃率

PEG-IFN α 2b とリバビリン併用療法での副作用は多く、上述した Study 1 での治験中止率は投与24週以内に12%, 25週以上で8%, 合計20%である。またいずれかの薬剤を減量せざるを得なかった症例は投与24週以内に45%, 25週以上で19%, 合計64%に及ぶ。有害事象の発現頻度を表4に示した。貧血と血球減少は治療中細心の注意をもって対応する必要がある。表5に示した治療中の薬剤減量、中止の一応の基準が設けられている。

本併用療法は現在世界共通の標準的治療であり、本邦においては2004年12月から HCV 1b 型・

表4 有害事象の発現頻度

一発現率が30%以上で、両群間に5%以上の差がある項目一

	PEG-IFN α 2b + Ribavirin	IFN α 2b + Ribavirin		PEG-IFN α 2b + Ribavirin	IFN α 2b + Ribavirin
白血球数減少	96.5%	87.0%	食欲不振	83.9%	90.5%
ヘモグロビン減少	86.6%	74.7%	関節痛	77.6%	83.4%
赤血球数減少	80.3%	71.1%	筋痛	72.8%	77.9%
ヘマトクリット減少	78.5%	67.6%	不眠症	66.9%	75.1%
そう痒症	61.0%	52.2%	脱毛症	68.5%	73.9%
注射部位紅斑	41.7%	3.6%	悪心	57.9%	64.4%
血中ビリルビン増加	35.0%	29.2%	血小板数減少	46.1%	52.6%
			リンパ球数増加	35.8%	42.3%
			下痢	33.1%	41.9%
			網状赤血球百分率減少	28.0%	34.4%
			好中球数増加	18.5%	30.8%

表5 ベグインターフェロン α 2b・リバビリン併用療法時の血液検査値と対応

	投与前	減量	中止
ベグインターフェロン白血球(/mm ³)	4000以上	1500未満	1000未満
好中球数(/mm ³)	1,500以上	750未満	500未満
血小板数(/mm ³)	10万以上	8万未満	5万未満
リバビリンヘモグロビン値(g/dl)	12以上	10未満	8.5未満

注意: 投与前値を確認して治療する

高ウイルス量症例に対して保険適応となった。

インターフェロン α 製剤の自己注射療法

2005年4月27日付けでC型慢性肝炎に対してインターフェロン α 製剤の自己注射療法が認められた。市販の IFN α 製剤としては、スミフェロン[®]、アドバフェロン[®]、イントロンA[®]、オーアイエフ[®]、ロフェロン[®]がある。留意事項は以下のとおりである。1) 在宅自己注射に係る指導管理は、当該在宅自己注射管理量の算定の対象である注射の適応となる疾患の患者に対する診療を日常の診療において行なっており、十分な経験を有する医師が行なうこと、2) 在宅自己注射の導入前には、入院または週2回若しくは3回以上の外来、往診若しくは訪問診療により、医師による十分な教育機関を取り、十分な指導を行なうこと、3) かかりつけ医と異なる医師が在宅自己注射に係る指導管理を行なう場合には、緊急時の対応について当該かかりつけ医師とも十分な連携を図ること、4) 在宅自己注射の実施に伴う廃棄物の適切な処理方法等についても、併せて指導をおこなうこと、となっている。ただし PEG-IFN は対象ではないので注意を要する。また、2週に1回は外来、往診又は訪問診療を行なうことが義務付けられている。留意事項でも触れたが、注射の仕方或使用済み針の扱いなど患者指導は十分行なう必要がある。

抗ウイルス療法の治療効果予測因子

従来言われているものとして、ウイルス因子の