

表 1 CLIA法再現性

a. 測定内再現性(10重測定)

| | 陽性コントロール 1 (50 fmol/l) | 陽性コントロール 2 (300 fmol/l) |
|-------|---------------------------|----------------------------|
| CV(%) | 3.9 | 5.4 |

b. 測定間再現性(トータルCV: 2重測定×2回測定×5日)

| | 陽性コントロール 1 (50 fmol/l) | 陽性コントロール 2 (300 fmol/l) | 低濃度パネル (60 fmol/l) | 中濃度パネル (300 fmol/l) | 高濃度パネル (7,500 fmol/l) |
|-------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| CV(%) | 4.9 | 3.1 | 5.7 | 4.4 | 7.0 |

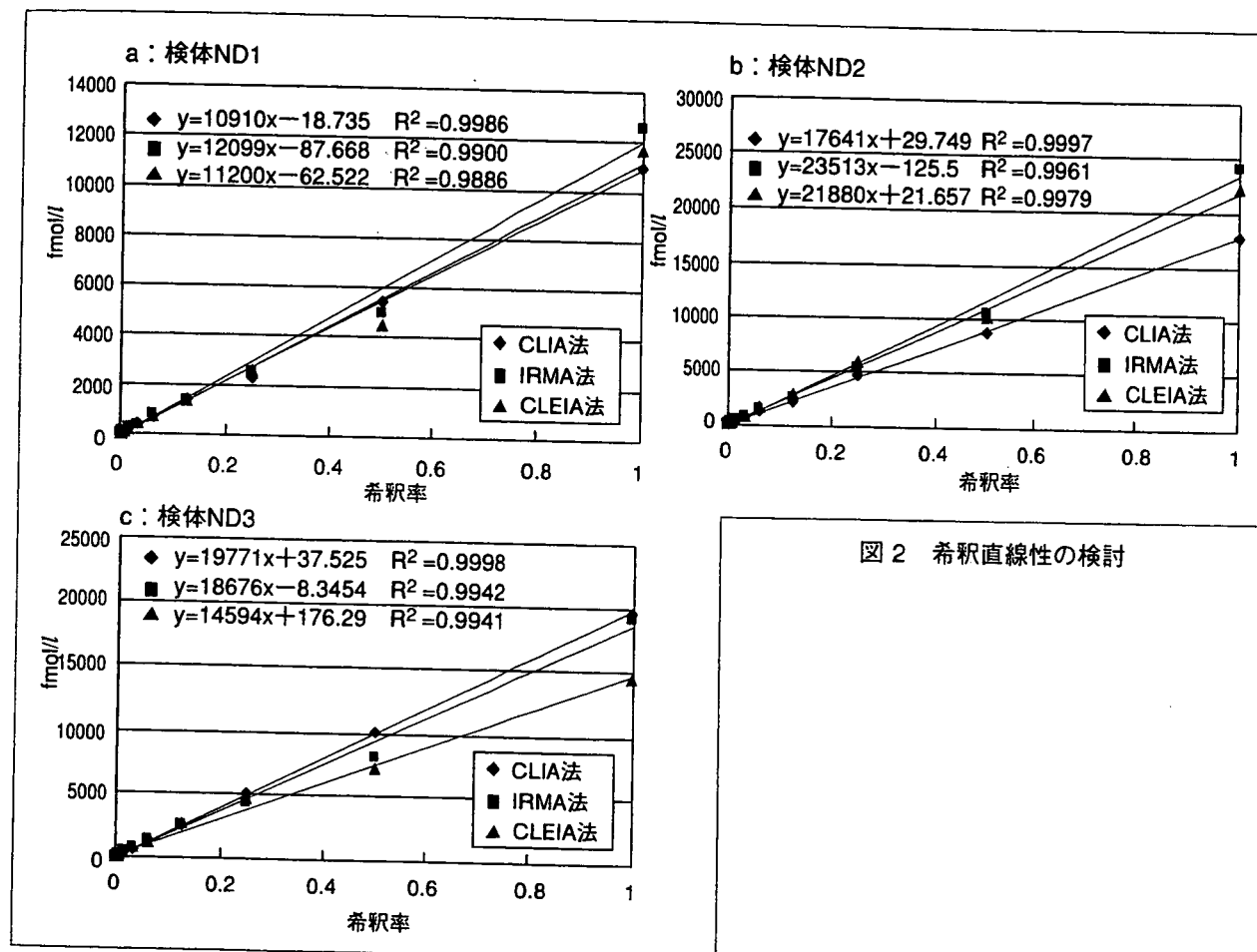


図 2 希釈直線性の検討

た。また測定方法間の検出率の有意差検定には、McNemar testを用いた。

結 果

1. 基礎的検討

(1) 再現性

2濃度の陽性コントロールを用いて10回連続測定した測定内再現性の結果、および5濃度の陽性コントロールおよび陽性パネル血清を用いた測定間再現性(トータルCV)の結果を表1-a, bに示す。変動係数(CV%)は、測定内では3.9-5.4%

測定間トータルCVでは3.1-7.0%と良好な結果を示した。

(2) 希釈感度

CLIA法は良好な直線性を示し(図2)、他の2つの現行HCVコア抗原測定法に比較して4倍から8倍高い希釈感度(陽性であった最大希釈ポイント)を示した(表2)。

2. 臨床的検討

(1) 臨床感度

a) セロコンバージョンパネルにおける感度検討に用いた4ロットのセロコンバージョン

表2 HCVコア抗原測定系における希釈感度比較

| | 希釈 | CLIA法 | | | IRMA法 | | | CLEIA法 | |
|--------|------|----------|------------|--------|--------|------------|--------|--------|------------|
| | | fmol/l | % Recovery | | fmol/l | % Recovery | | fmol/l | % Recovery |
| 検体ND-1 | 2^0 | 10979.50 | | | 12600 | | | 11700 | |
| | 2^1 | 5436.33 | 99.0% | | 5000 | 79.4% | | 4470 | 74.4% |
| | 2^2 | 2314.32 | 84.3% | | 2500 | 79.4% | | 2590 | 88.5% |
| | 2^3 | 1392.75 | 101.5% | | 1350 | 85.7% | | 1340 | 91.6% |
| | 2^4 | 699.55 | 101.9% | | 763 | 96.9% | | 687 | 93.9% |
| | 2^5 | 360.76 | 105.1% | | 347 | 88.1% | 93.0% | 385 | 105.3% |
| | 2^6 | 186.27 | 108.6% | 103.7% | 208 | 105.7% | | 177 | 96.8% |
| | 2^7 | 97.32 | 113.5% | | 99 | 100.6% | | 102 | 111.6% |
| | 2^8 | 45.55 | 106.2% | | 49 | 99.6% | | 41 | 89.7% |
| | 2^9 | 24.10 | 112.4% | | 25 | 101.6% | | 23 | 100.6% |
| | 2^10 | 11.00 | 102.5% | | 11 | | | 9 | |
| | 2^11 | 5.69 | 106.1% | | 8 | | | 0 | |
| | 2^12 | 2.65 | | | 4 | | | 0 | |
| | 2^13 | 0.7 | | | 5 | | | 0 | |
| 検体ND-2 | 2^0 | 17708.27 | | | 24100 | | | 22200 | |
| | 2^1 | 8661.90 | 97.8% | | 10500 | 87.1% | | 10100 | 91.0% |
| | 2^2 | 4666.48 | 105.4% | | 5250 | 87.1% | | 5940 | 107.0% |
| | 2^3 | 2211.29 | 99.4% | | 2570 | 85.3% | | 2840 | 102.3% |
| | 2^4 | 1155.45 | 104.4% | | 1370 | 91.0% | | 1540 | 111.0% |
| | 2^5 | 635.87 | 114.9% | | 746 | 99.1% | 93.0% | 697 | 100.5% |
| | 2^6 | 327.72 | 118.4% | | 355 | 94.3% | | 408 | 117.6% |
| | 2^7 | 162.76 | 117.6% | 114.6% | 196 | 104.1% | | 182 | 104.9% |
| | 2^8 | 82.63 | 119.5% | | 91 | 96.7% | | 94 | 108.4% |
| | 2^9 | 43.47 | 125.7% | | 47 | 99.9% | | 38 | 87.6% |
| | 2^10 | 23.29 | 134.6% | | 20 | 85.0% | | 21 | 96.9% |
| | 2^11 | 10.24 | 118.4% | | 10 | | | 0 | |
| | 2^12 | 5.17 | 119.5% | | 7 | | | 0 | |
| | 2^13 | 2.33 | | | 5 | | | 0 | |
| 検体ND-3 | 2^0 | 19658.68 | | | 19300 | | | 14600 | |
| | 2^1 | 10154.09 | 103.3% | | 8120 | 84.1% | | 7250 | 99.3% |
| | 2^2 | 5101.30 | 103.8% | | 4330 | 89.7% | | 4600 | 126.0% |
| | 2^3 | 2529.08 | 102.9% | | 2620 | 108.6% | | 2640 | 144.7% |
| | 2^4 | 1299.45 | 105.8% | | 1340 | 111.1% | | 1250 | 137.0% |
| | 2^5 | 667.28 | 108.6% | | 723 | 119.9% | | 704 | 154.3% |
| | 2^6 | 329.10 | 107.1% | 109.1% | 402 | 133.3% | 117.2% | 313 | 137.2% |
| | 2^7 | 157.33 | 102.4% | | 198 | 131.3% | | 166 | 145.5% |
| | 2^8 | 83.16 | 108.3% | | 109 | 144.6% | | 78 | 136.8% |
| | 2^9 | 44.06 | 114.8% | | 48 | 127.3% | | 35 | 122.7% |
| | 2^10 | 21.21 | 110.5% | | 23 | 122.0% | | 19 | |
| | 2^11 | 10.61 | 110.5% | | 10 | | | 0 | |
| | 2^12 | 6.31 | 131.5% | | 6 | | | 0 | |
| | 2^13 | 2.82 | | | 4 | | | 0 | |

パネルのうち、3パネルにおいてCLIA法は、IRMA法、CLEIA法、RNA定量法と同じ採血ポイントから陽性を示した。他の1パネル(ロット：HCV9054)においてCLIA法は、対照3法に比較して1採血ポイント(22日)早く陽性として検出した(表3)。また、ZeptoMetrix社の添付データシート中のHCV抗体との比較では、CLIA法は、

検討したすべてのパネルにおいて2~6採血ポイント(22-34日)、平均27日早く検出した。

b) HCV RNA陽性検体の検出率

HCV RNA陽性検体を用いたCLIA法と各対照法との検出率の比較結果を表4-a, b, cに示す。388例を用いたCLIA法とIRMA法との比較では検出率はそれぞれ98.7%(383/388)、95.6%(371/388)で

表3 セロコンバージョンパネルにおける感度比較

| パネルロット | HCV抗体 | CLIA法 | IRMA法 | CLEIA法 | RNA 定量法 |
|---------|-------|-------|-------|--------|------------|
| HCV6213 | 37日目 | 11日目 | 11日目 | 11日目 | 11日目 |
| HCV6222 | 40日目 | 17日目 | 17日目 | 17日目 | 17日目 |
| HCV9054 | 77日目 | 52日目 | 74日目 | 74日目 | 74日目 |
| HCV9055 | 65日目 | 31日目 | 31日目 | 31日目 | 31日目 |

各測定法において陽性を示した最初の採血日

表4 HCV RNA陽性検体の検出率

a: IRMA法との比較

| HCV RNA陽性388例 | | IRMA法 | |
|---------------|---|-------|----|
| | | + | - |
| CLIA法 | + | 371 | 12 |
| | - | 0 | 5 |

b: CLEIA法との比較

| HCV RNA陽性202例 | | CLEIA法 | |
|---------------|---|--------|----|
| | | + | - |
| CLIA法 | + | 188 | 11 |
| | - | 0 | 3 |

c: RNA定量法との比較

| HCV RNA陽性617例 | | RNA定量法 | |
|---------------|---|--------|---|
| | | + | - |
| CLIA法 | + | 609 | 0 |
| | - | 5 | 3 |

$P=0.0005$ で検出率に有意差あり

$P=0.0010$ で検出率に有意差あり

$P=0.0625$ で検出率に有意差なし

あり, CLIA法はIRMA法に比較して有意に高い検出率であった($P=0.0005$)。202例を用いたCLIA法とCLEIA法との比較では検出率はそれぞれ98.5% (199/202), 93.1% (188/202)であり, CLIA法はCLEIA法に比較して有意に高い検出率であった($P=0.0010$)。617例を用いたCLIA法とRNA定量法との比較では検出率はそれぞれ98.7% (609/617), 99.5% (614/617)であり, CLIA法とRNA定量法の検出率に有意差はなかった($P=0.0625$)。

(2) 既存HCVコア抗原測定法およびRNA定量法との相関性

CLIA法とIRMA法およびCLEIA法との相関性を検討したところ, 相関係数(r)は0.942, 0.960であり良好であった(図3-a, b)。また, RNA定量法との相関係数(r)は0.887であり良好であった(図3-c)。

(3) IFNによる抗ウイルス療法の経過観察および効果予測

a) 抗ウイルス剤投与直後(1日)の経時的变化と減少率

IFNによる抗ウイルス療法を受けた46症例のうち治療開始前および治療1日目のポイントを測定しえた43症例につき, CLIA法およびRNA定量法を用いて, 治療前から1日目の変化につき検討した。CLIA法, RNA定量法とも1日目で陰性化した症例はみられなかったが, 2 log以上低下した症例は, 両測定法とも同症例1例(2.3%)であった(表5)。1 log以上2 log未満の低下は, CLIA

法, RNA定量法それぞれ46.5% (20症例)および34.9% (15症例)であった。1 log未満の低下であったものはCLIA法, RNA定量法それぞれ48.8% (21症例)および60.5% (26症例)であった。なお, 両測定法とも治療前に比較して上昇した症例が同症例1例(2.3%)みられた。

CLIA法およびRNA定量法における治療開始前から治療1日までの変動を図4-aおよび図4-bにそれぞれ示す。CLIA法における治療前の値は, 92.82-13731.28 fmol/l (平均値; 4371 fmol/l, 中央値; 2944 fmol/l), 治療1日の値は, 12.76-3020.67 fmol/l (平均値; 640 fmol/l, 中央値; 274 fmol/l)であった。同様にRNA定量法における治療前の値は, 120-2000 KIU/ml (平均値; 706 KIU/ml, 中央値; 640 KIU/ml), 治療1日の値は, 4.7-860 KIU/ml (平均値; 201 KIU/ml, 中央値; 150 KIU/ml)であった。CLIA法およびRNA定量法とも治療前の値に比較して治療1日の値は, 統計学的に有意に低下していた($P<0.001$)。

b) 抗ウイルス療法でのウイルス量の変動

C型慢性肝炎患者のINF抗ウイルス療法におけるウイルス量変動の代表例を示す(図5)。症例KM09は, ジェノタイプ1b型, 治療前高ウイルス量の難治例であったが, 抗ウイルス療法(Peg-IFN/リバビリン併用療法)により治療終了時に陰性化し, その後も継続的ウイルス排除(SVR)となった症例である。治療開始12週目までCLIA法は陽性であったが, IRMA法では4週目まで, RNA定量

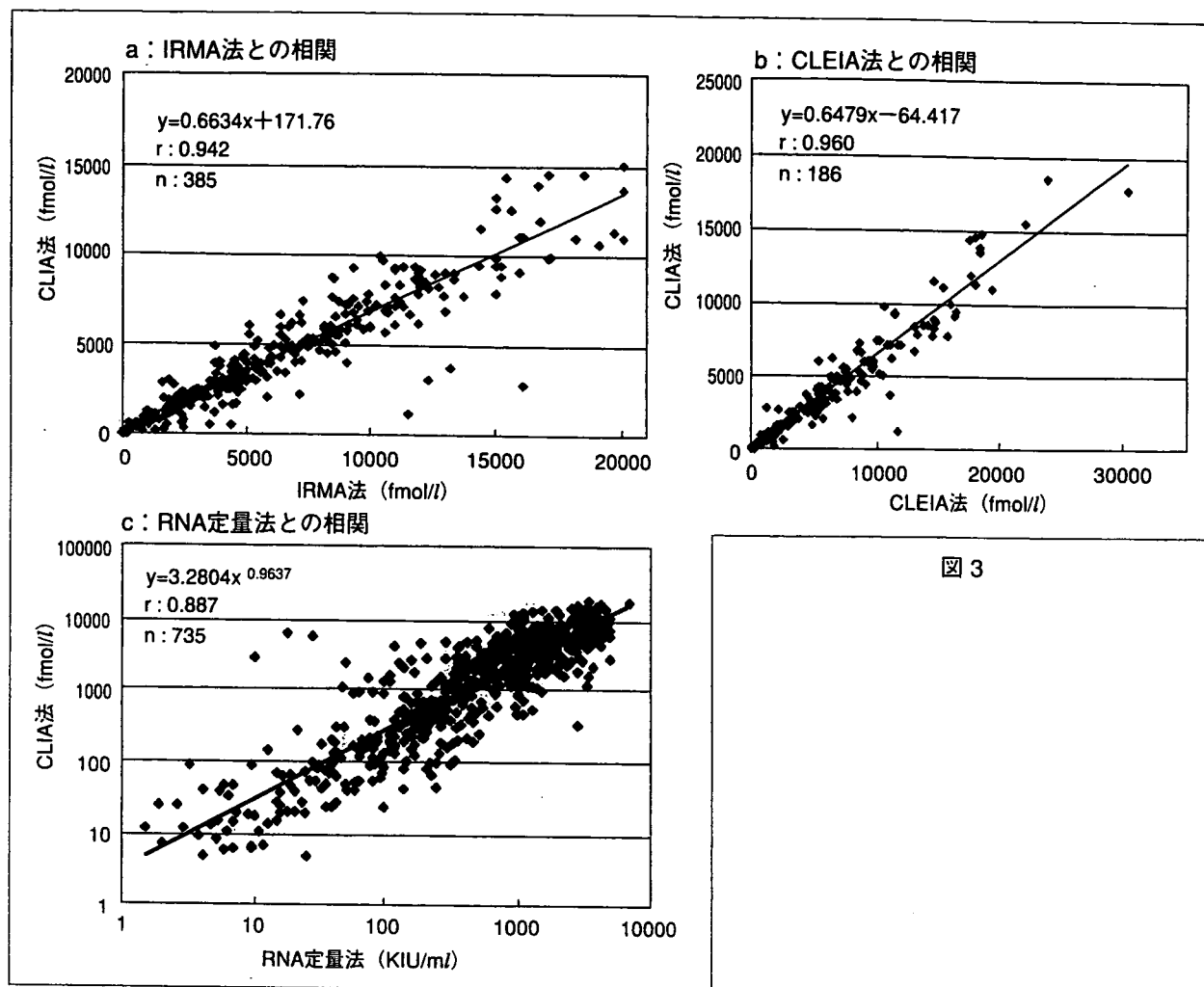


表 5 抗ウイルス剤投与直後(1日)の変化量

| 測定法 | 各変動を示した症例数の比率(症例数) | | | | 合計 |
|--------|--------------------|----------------|------------|----------|----|
| | 2 log以上の低下 | 1 log以上2 log未満 | 1 log未満の低下 | 上昇 | |
| CLIA法 | 2.3% (1) | 46.5% (20) | 48.8% (21) | 2.3% (1) | 43 |
| RNA定量法 | 2.3% (1) | 34.9% (15) | 60.5% (26) | 2.3% (1) | 43 |

法は8週目まで陽性であり、各測定間で乖離がみられた。なお、RNA定性法では12週まで陽性であることが確認されている。

上記症例を含めた抗ウイルス療法26症例におけるウイルス陰性化時期のまとめを表6に示す。26症例におけるIRMA法との比較では、CLIA法は9症例で1採血ポイント以上長く陽性が続き、17症例で同じ採血ポイントで陰性化した。CLIA法がIRMA法に比較して早期のポイントで陰転化した症例はみられなかった。乖離した9症例各ポイントともRNA定性法、RNA定量法のいずれかあるいは両方で陽性が確認されている。

合計6症例におけるCLEIA法との比較では、CLIA法は1症例で1採血ポイント以上長く陽性が続き、5症例で同じ採血ポイントで陰性化した。CLIA法がCLEIA法に比較して早期のポイントで陰転化した症例はみられなかった。乖離した1症例各ポイントともRNA定性法、RNA定量法のいずれかで陽性が確認されている。

合計26症例におけるRNA定量法との比較では、CLIA法は5症例で1採血ポイント以上長く陽性が続き、5症例で1採血ポイント早く陰性化し、その他16症例では同じ採血ポイントで陰性化した。両測定法で乖離のみられた10症例各ポイン

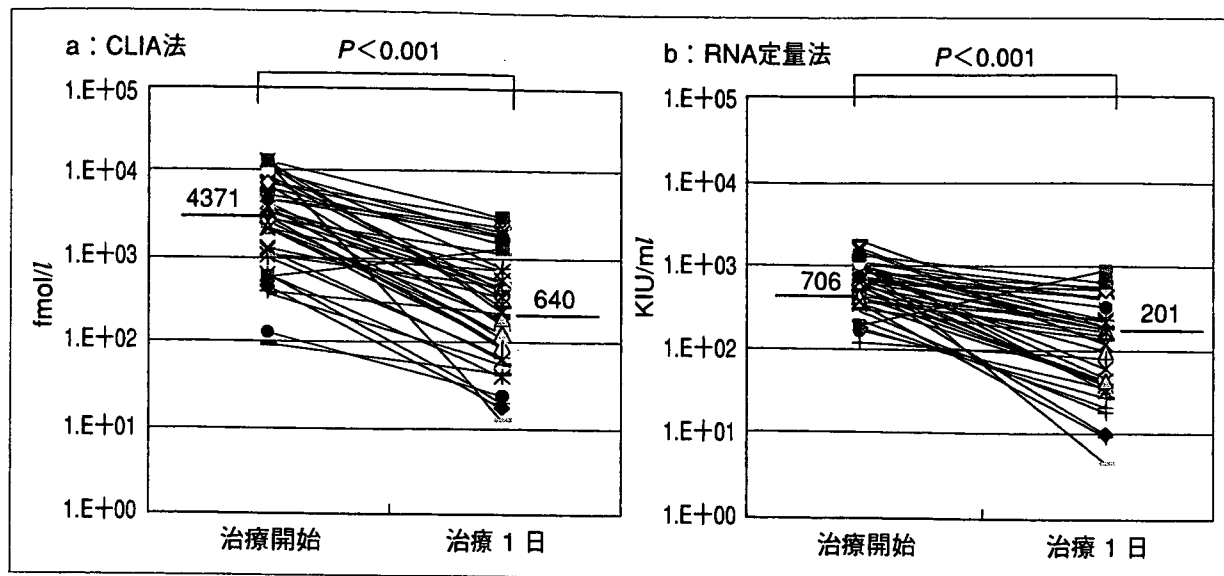


図4 抗ウイルス剤投与直後のウイルス量変化

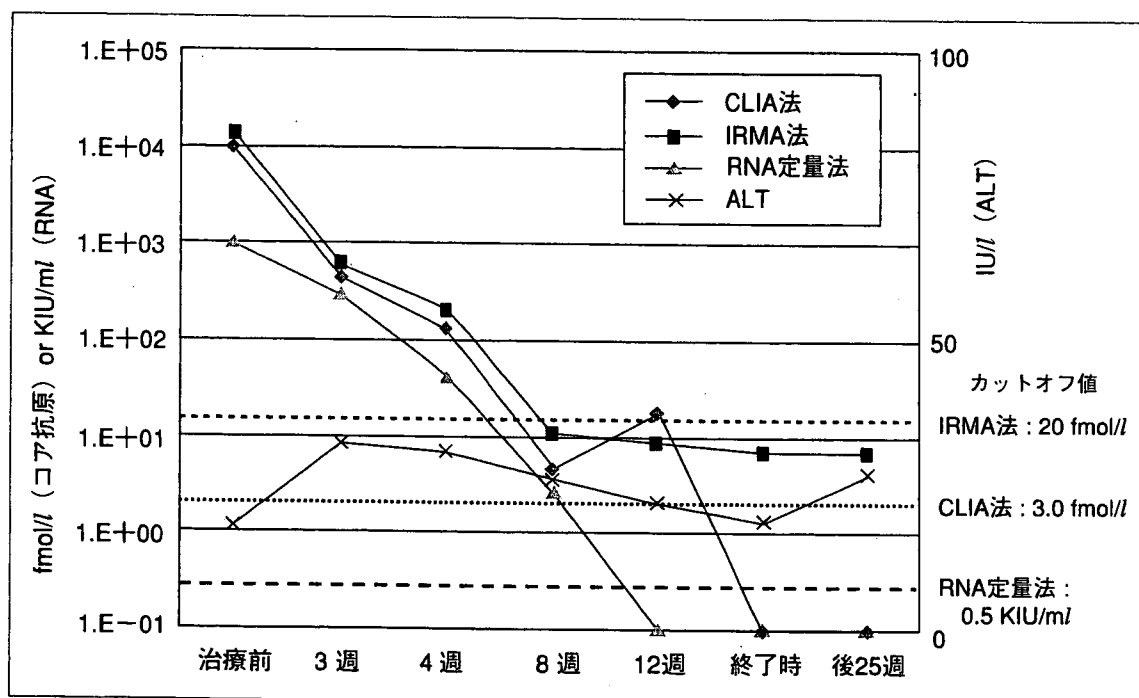


図5 抗ウイルス療法著効例におけるウイルス量変動(KM-09)

トともRNA定性法で陽性が確認されている。

c) 治療前のウイルス量と抗ウイルス療法効果

治療前のウイルス量と治療効果について、前項検討の26症例のうち、治療前ポイントを測定しえた19症例をSVR(治療終了後継続著効)、non-SVR(無効あるいは再燃)に分類したところSVRが11例、non-SVRが8例であった。SVR群における治療前ウイルス量をみると、CLIA法では120.75-10026.80 fmol/l(平均値; 2448 fmol/l, 中央値;

536 fmol/l), IRMA法では174-15600 fmol/l(平均値; 4128 fmol/l, 中央値; 835 fmol/l), RNA定量法では98-2700 KIU/ml(平均値; 569 KIU/ml, 中央値; 200 KIU/ml)であった(図6-a, b, c)。Non-SVR群では、CLIA法は344.79-11086.71 fmol/l(平均値; 4499 fmol/l, 中央値; 3852 fmol/l), IRMA法では344-13500 fmol/l(平均値; 5931 fmol/l, 中央値; 4965 fmol/l), RNA定量法では60-5000 KIU/ml(平均値; 1470 KIU/ml, 中央値; 1000

表 6 各測定法によるウイルス陰性化時期の比較

| CLIA法が右の対照法と比較して | 対照法 | | |
|-----------------------|-------|--------|--------|
| | IRMA法 | CLEIA法 | RNA定量法 |
| 遅れて陰性化した(長く陽性であった)症例数 | 9*1 | 1*1 | 5*2 |
| 同時に陰性化した症例数 | 17 | 5 | 16 |
| 早期に陰性化した症例数 | 0 | 0 | 5*2 |
| 症例合計 | 26 | 6 | 26 |

*1 RNA定性法あるいはRNA定量で陽性が確認されている

*2 RNA定性法で陽性が確認されている

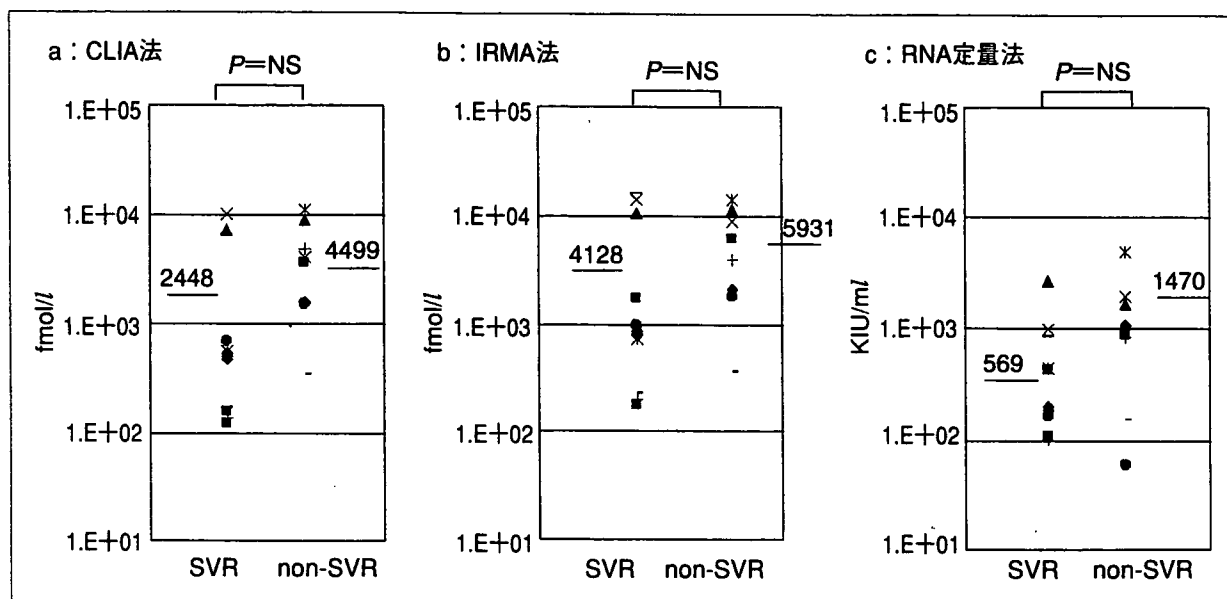


図 6 各測定法における治療前ウイルス量

KIU/ml)であった。SVR群とnon-SVR群における治療前ウイルス量を比較するとCLIA法, IRMA法, RNA定量法ともSVR群よりもnon-SVR群で治療前ウイルス量が高い結果であったが統計学的に有意な差はみられなかった。

これら19症例につきCLIA法およびRNA定量法の治療効果予測につき検討した(表 7)。治療前ウイルス量が, C型慢性肝炎の治療ガイドライン(厚生労働省研究班)上の低ウイルス量(HCVコア抗原では300 fmol/l未満, RNA定量法では100 KIU/ml未満)に相当する症例はCLIA法では4例存在し, すべてSVRであった。よって300 fmol/lを指標とした場合のCLIA法のpositive predictive value (PPV)は100%(4/4)であった。またRNA定量法での低ウイルス量症例は2例みられ, うち1例がSVRであったことより, RNA定量法のPPVは50%(1/2)であった。一方, CLIA法において300

fmol/l以上を示した治療前高ウイルス量症例は15例存在し, うち8例がnon-SVRであった。よってCLIA法のnegative predictive value (NPV)は53%(8/15)であった。またRNA定量法で100KIU/ml以上の高ウイルス量症例は17例みられ, うち7例がnon-SVRであったことより, RNA定量法のNPVは41%(7/17)であった。

d) 現行C型肝炎ウイルス検診検査との一致率および検診検体群における特異性検討

岩手県予防医学協会にて2005年12月から2006年4月にC型肝炎ウイルス検診を受診した5,027例の検診検体をCLIA法にて測定したところ, 陽性は24例, 陰性は5,003例であった。CLIA法で陽性を示した24例は, 現行検診検査法でHCVキャリアと判定された24例と一致した(表 8)。よってCLIA法による判定と現行検診検査法による判定の一致率は100%(5027/5027)であり, また検

表 7 治療開始前のウイルス量による治療効果予測

| 治療開始前のウイルス量 | CLIA法 | | RNA定量法 | |
|---|------------|---------|------------|---------|
| | SVR | non-SVR | SVR | non-SVR |
| 低ウイルス量症例*1 | 4 | 0 | 1 | 1 |
| 高ウイルス量症例*2 | 7 | 8 | 10 | 7 |
| PPV(コア抗原で300 fmol/l 未満, RNAで100KIU/ml未満を指標とした場合) | 100% (4/4) | | 50% (1/2) | |
| NPV(コア抗原で300 fmol/l 以上, RNAで100KIU/ml以上を指標とした場合) | 53% (8/15) | | 41% (7/17) | |

*1 コア抗原で300 fmol/l未満, あるいはRNA定量法で100KIU/ml未満の症例数(厚生労働省研究班ガイドラインによる)

*2 コア抗原で300 fmol/l以上, あるいはRNA定量法で100KIU/ml以上の症例数(厚生労働省研究班ガイドラインによる)

表 8 現行検診検査法とCLIA法の判定一致率

| 一致率: 100% (5027/5027) | | 現行検診検査法 | |
|-----------------------|----------|---------|----------|
| | | HCVキャリア | 非HCVキャリア |
| CLIA法 | HCVキャリア | 24 | 0 |
| | 非HCVキャリア | 0 | 5003 |

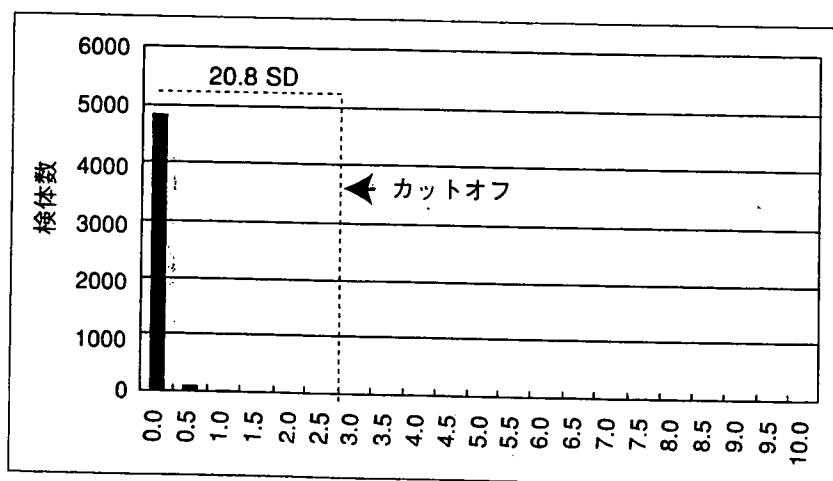


図 7 陰性検診検体の分布

診検体群における特異性も100% (5003/5003)であった。つぎに陰性検体群の分布を図7に示す。CLIA法のカットオフ3.00 fmol/lは陰性群より十分離れている(20.8 SD)ことが確認された。

考 察

HCVコア抗原の測定は, HCV RNA定量法と同様にHCVウイルス量を反映する測定法として開発され, HCV RNAと良好な相関性を示すことから抗ウイルス療法のモニタリングや治療効果判定など臨床応用されている。しかしながら既存のHCVコア抗原測定法は, 測定感度の点で十分とは言えず, また検体前処理などの煩雑な用手

法の工程が必要であり測定結果までに時間を要することなどもあり, 性能や操作性などに問題を抱えていた。このため高感度化かつ検体前処理を含めた工程が簡略化(自動化)された新しいHCVコア抗原測定法であるCLIA法が開発された。今回われわれが検討したCLIA法は, 全自動免疫測定装置ARCHITECT®アナライザーi2000/i2000SRを用いることにより従来は用手法で行われていた検体前処理を含めたすべての工程が自動化され, 短時間(約37分)で結果を得ることができる新しいHCVコア抗原測定法である⁹⁾。CLIA法は, 3.00 fmol/lから20,000 fmol/lまでの広い測定範囲をもつ。

陽性コントロールおよび陽性パネル血清を用いたCLIA法の同時および測定間再現性は低濃度域から高濃度域まで良好な結果を示した。またHCV RNA陽性検体を用いた希釈試験では良好な直線性を示し、従来のHCVコア抗原法(IRMA法およびCLEIA法)に比較して高い希釈感度を示した。また、IRMA法、CLEIA法、およびRNA定量法と良好な相関性を示した。以上よりCLIA法は低濃度域から高濃度域の広い測定範囲にわたり十分な再現性・定量性をもつことが示された。このことからCLIA法を用いた測定ではRNA定量法で見られるオリジナル法とハイレンジ法の両者を使い分ける必要や両測定値の乖離などの問題¹⁰⁾¹¹⁾はないと考えられる。

HCV RNA陽性群におけるCLIA法の検出率は、既存のHCVコア抗原であるIRMA法およびCLEIA法に比較して有意に高く、またRNA定量法と同等であった。また4ロットのセロコンバージョンパネルを用いた検討では1ロットのパネルにおいてCLIA法は、IRMA法、CLEIA法、およびRNA定量法よりも早期に検出した(他の3ロットは同じポイントから陽転)。以上よりCLIA法の臨床感度は既存のHCVコア抗原に比較して高く、RNA定量法と同等であることが示された。

つぎに治療開始から抗ウイルス剤投与直後(1日)の経時的変化を検討したところ、CLIA法ではRNA定量法と同様に投与後1日で有意に値が低下し、IFNの第1相効果を反映することが明らかとなった。変化率をみるとCLIA法では、RNA定量法と比較して大きな変化を示す症例が多く存在していた。IFN投与後のHCV動態には投与直後の第1相(約24時間までの急激なウイルス量減少)と第2相(24時間以降の緩徐な減少)がみられ¹²⁾、その動きにより以降の治療効果予測の可能性が報告されている¹³⁾。既述したようにCLIA法は十分な定量性を備えた高濃度域までの広い測定範囲を持っており、また結果が得られるまでの時間も約37分と短時間であることから、よりタイムリーなIFN第1相での治療効果および第2相以降の治療効果予測が可能となると考える。

さらに抗ウイルス療法におけるウイルス排除(陰性化)時期について検討したところ既存のHCVコア抗原測定法であるIRMA法およびCLEIA法で

は感度の差により治療中早期に陰性化、あるいは治療終了後再燃時期確認が遅れる場合がみられたが、CLIA法はRNA定量法と同程度のウイルス陰性化および再燃時期を示した。なおCLIA法を用いた場合も、RNA定量法同様に陰性化時にRNA定性法での確認が必要と考える。

C型慢性肝炎に対するIFNによる抗ウイルス療法ではウイルスジェノタイプ、治療前ウイルス量等と治療効果が密接に関連しており、ウイルス量が少ないほどIFNによるウイルス排除効果が得やすいことが報告されている。治療前から治療終了後までの経過観察ができた19症例の検討でも統計学的には有意ではなかったもののSVR群ではnon-SVR群に比較してCLIA法を含めたすべての測定法において治療前ウイルス量は低い結果であった。

さらに治療前ウイルス量と治療効果(SVR; 11症例, non-SVR; 8症例)について検討を加えた。厚生労働省研究班C型肝炎診療ガイドライン上の区分である高ウイルス量と低ウイルス量に分類したところ、CLIA法による判定では300 fmol/l未満の治療前低ウイルス例4症例すべてがSVRとなり(PPV; 100%), また300 fmol/l以上の治療前高ウイルス例15例のうち、8症例がnon-SVRであった(NPV; 53%)。一方RNA定量法による判定では2例の治療前低ウイルス例(100 KIU/ml未満)のうち1例がSVRであり(PPV; 50%), また17例の治療前高ウイルス例(100 KIU/ml以上)のうち7症例がnon-SVRであった(NPV; 41%)。このように治療前ウイルス量の高・低で評価したところCLIA法はRNA定量法に比較して高いPPV, NPVを示した。治療前のHCVコア抗原量が低いほど抗ウイルス療法による治療効果が良好であり、SVR率が高いことが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。今回の結果より治療前のCLIA法の値も同様に治療効果判定因子になりうる可能性が示唆された。今後さらに症例数を増やし確認が必要と考える。

5,027例のC型肝炎検診検体を用いた検討でCLIA法は良好な特異性を示し、また陰性群の分布からカットオフ値3.00 fmol/lまで十分に離れており、既述の臨床感度や治療モニタリングの結果と合わせ、CLIA法のカットオフ値設定の妥当性が確

認された。またCLIA法の測定結果によるHCVキャリア検出判定は現行のC型肝炎ウイルス検査による判定と一致する結果であったことからHCVキャリアの掘り起こしに向けた検診検査などに対してCLIA法適応の可能性が示唆された。今後追加検討による確認が望まれる。

以上総合すると、CLIA法はRNA定量法と同等の臨床的感度と良好な特異性をもつこと、IFNによる抗ウイルス療法の経過観察、効果判定、効果予測に対してRNA定量法と同様に適用可能であることなどから、臨床的有用であると考えらる。

文 献

- 1) Suzuki T, Tanaka E, Matsumoto A, et al. Usefulness of simple assays for serum concentration of hepatitis C virus RNA and HCV genotype in predicting the response of patients with chronic hepatitis C to interferon-alpha 2a therapy. *J Med Virol* 1995 ; 46 : 162.
- 2) 坪田昭人, 荒瀬康司, 鈴木義之, ほか. 高HCV量C型慢性肝炎への治療に対応した高濃度領域測定用アンプリコアHCVモニター(ハイレンジ法)の基礎的および臨床的有用性の検討. *医学と薬学* 2004 ; 51 : 159.
- 3) Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, et al. Demonstration of a hepatitis C virus-specific antigen predicted from the putative core gene in the circulation of infected hosts. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 667.
- 4) 田中榮司, 清澤研道, 吉澤浩司, ほか. オートHCV抗原 IRMAテストの評価. *医学と薬学* 2001 ; 46 : 247.
- 5) 安田清美, 飯野四郎. 高感度HCVコア蛋白定量試薬のC型慢性肝炎診断および治療への適用. *医学と薬学* 2002 ; 47 : 651.
- 6) Halfon P, Bourliere M, Halimi G, et al. Assessment of spontaneous fluctuations of viral load in untreated patients with chronic hepatitis C by two standardized quantitation methods : Branched DNA and Amplicor Monitor. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36 : 2073.
- 7) Tanaka Y, Takagi K, Fujihara T, et al. High stability of enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen-evaluation before and after incubation at room temperature. *Hepatol Res* 2003 ; 26 : 261.
- 8) 東本牧子, 高橋正彦, 千葉正志. 希釈系列検体を用いた第2世代HCVコア抗原法とRT-PCR法によるC型肝炎ウイルス量測定能の検討. *医学検査* 2004 ; 53 : 964.
- 9) Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, et al. A fully automated and highly sensitive immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen [abstract]. *Vox Sang* 2007 ; 93 Suppl 1 : 132.
- 10) 太田浩敏, 竹村正男, 古田伸行, ほか. C型肝炎ウイルス(HCV)定量の臨床的意義とその問題点—PCR法とCLEIA法との比較—. *臨床病理* 2004 ; 52 : 813.
- 11) 古村菜穂子, 黒田雅顕, 宮澤幸久, ほか. アンプリコアモニター法による高濃度域HCV RNA測定の有用性とHCVコア抗原との比較. *日本臨床検査自動化学会誌* 2005 ; 30 : 748.
- 12) Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science* 1998 ; 282 : 103.
- 13) Layden JE, Layden TJ, Rajender Reddy K, et al. First phase viral kinetic parameters as predictors of treatment response and their influence on the second phase viral decline. *J Viral Hep* 2002 ; 9 : 340.
- 14) 東本牧子, 高橋正彦, 上久律子, ほか. C型慢性肝炎のribavirin併用IFN治療におけるHCVコア抗原測定の臨床的有用性. *臨床病理* 2006 ; 54 : 111.
- 15) 釈迦堂 敏, 田中 崇, 猪俣慎二郎, ほか. C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン, リバビリン併用療法24週時の血清HCV RNA陰性予測におけるコア抗原の有用性. *肝臓* 2006 ; 47 : 411.

<Abstract>

Evaluation of a Highly Sensitive Chemiluminescent Immunoassay "ARCHITECT HCV Ag" for HCV core antigen.

by

Hiromitsu KUMADA, M.D.¹⁾, Kendo KIYOSAWA, M.D.²⁾, Mariko KOBAYASHI, B.S.³⁾, Tomiko KOYAMA, Ph.D.⁴⁾, Eiji TANAKA, M.D.²⁾, Rumiko NAKAO, M.S.⁵⁾, Akihiro MATSUMOTO, M.D.²⁾, Kiyomi YASUDA, M.D.⁶⁾, Hiroshi YATSUHASHI, M.D.⁵⁾, Hiroshi YOSHIZAWA, M.D.⁷⁾ and Shiro IINO, M.D.⁶⁾

from

¹⁾Department of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, ²⁾Department of Medicine (Gastroenterology), Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, ³⁾Research Institute of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, ⁴⁾Iwate Health Service Association, Morioka, ⁵⁾Clinical Research Center, National Hospital Organization, Nagasaki Medical Center, Ohmura, ⁶⁾Research Center for Liver Disease, Kiyokawa Hospital, Tokyo, ⁷⁾Department of Epidemiology, Infectious Disease Control and Prevention, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, JAPAN

The aim of this study is to evaluate a chemiluminescent immunoassay "ARCHITECT HCV Ag" (CLIA ; Abbott Laboratories) for HCV core antigen in human serum or plasma using clinical specimens. This is done primarily to check for potential utility in management of HCV-infected patients with anti-HCV therapy by Interferon. The CLIA showed good reproducibility (Intra assay CV% : 3.9- 5.4, inter assay CV% : 3.1- 7.0) and dilution linearity with a wide dynamic range (3.00- 20,000 fmol/L). The sensitivity of the CLIA with serially diluted HCV RNA positive specimens was 4- 8 times

higher than the current HCV core antigen assays. The CLIA showed better sensitivity with seroconversion panels vs. the HCV core antigen assays and HCV RNA quantitative assay. The detection for RNA positive samples by the CLIA was statistically better than or equivalent to the HCV core antigen assays and HCV RNA quantitative assay respectively. The correlation between the CLIA and the HCV core antigen assays or HCV RNA quantitative assay was also good. Specificity of the CLIA was excellent (100%) with health check specimens (n=5003). In the monitoring of the antiviral therapy by IFN, the CLIA closely tracked HCV RNA dynamics and allowed the monitoring of the treatment. The CLIA indicated better positive predictive value and negative predictive value for SVR vs. RNA quantitative assay when viral load was categorized by 300 fmol/L for HCV core Ag or by 100 KIU/mL for RNA.

In conclusion, it is suggested that the CLIA can be applicable in viral load monitoring and predicting treatment outcome in patients receiving antiviral therapy. The CLIA could be an alternative to HCV RNA quantitative assay with faster laboratory turn around time to results and easier handling of the assay in the clinical practice of hepatitis C patients.

* * *

[監修] 山田 剛太郎(川崎医科大学附属川崎病院肝臓・消化器病センター長)

第4回

肝癌進展抑制を目的とした病診連携の重要性 —高齡化する患者とその発癌率

八橋 弘

(国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター 治療研究部長)

C型慢性肝炎の自然経過

C型慢性肝炎の自然経過、発癌リスクを、肝線維化stage (fibrosis stage: F0~F4) を指標に表現したものが図1である。すなわち、HCV持続感染者は、肝機能障害すなわち肝細胞の破壊と再生を繰り返しながら、F0からF1、F2、F3、F4 (肝硬変) へと20年から30年以上かけてゆっくり階段を昇るように進展し、最終的には肝硬変を経由して肝癌が発生する。肝線維化stage別年間発癌率は、F0: 0.5%, F1: 1.5%, F2: 3%, F3: 5%, F4: 7~8%であり、stage進展とともに肝発癌のリスクも上昇する。特に50歳前後に急速に肝線維化stageが進展し、60歳を過ぎて高率に癌化する例

は珍しくない。肝線維化stageは、発癌の確率、発癌までの時間を推定する上で有用な指標であり、HCV持続感染者は可能な限り肝生検を行って発癌のリスクを把握することが望ましいが、肝線維化stageは、血小板数によってある程度の推定は可能である。

発癌抑止を目標とした インターフェロン治療

現在、C型慢性肝炎の治療は、週1回の投与でも抗ウイルス活性が持続するPEG-インターフェロン (IFN) と内服の抗ウイルス薬であるリバビリンを併用するPEG-IFN+リバビリン併用療法が治療の主流となっている。いわゆるIFN難治例とい

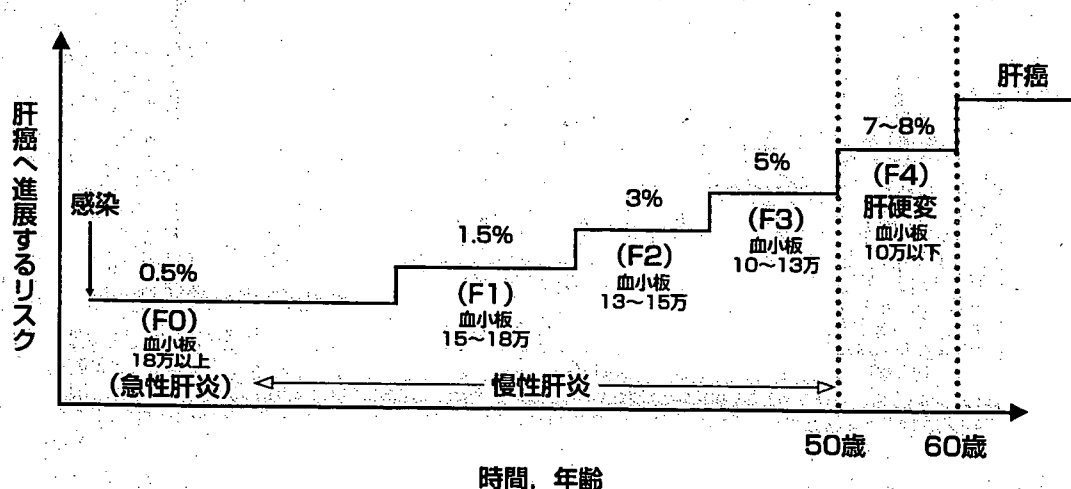


図1 C型慢性肝炎の自然経過，線維化 stage と年間発癌率

(国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター治療研究部)

われるHCV 1型高ウイルス症例に対する治療成績は、従来型のIFNの24週間投与では10%に満たないウイルス駆除率(著効率)であったが、PEG-IFN+リバビリン併用療法48週間投与での著効率は50~60%にまで上昇した。

一方、日本のC型慢性肝炎患者の多くは60歳以上の高齢者である。上記に述べたように、ALT値異常を示す高齢のC型慢性肝炎患者の多くは、肝線維化stageは進展し、肝癌リスクも高いことから、高齢者での抗ウイルス療法の必要性、緊急性は若年者よりも高い。しかし、これら高齢者では、PEG-IFN+リバビリン併用療法の副作用の出現頻度、程度ともに高く、また著効率も低いといった問題が存在する。

筆者らは、高齢者、肝線維化進展例、PEG-IFN+リバビリン併用療法無効例などを対象に、IFN少量長期投与、PEG-IFNの2~4週に1回投与を数年前から実施している。本治療法はウイルス駆除を目的とせず、肝線維化進展抑止、発癌抑止を目的とした治療である。

その治療の理論背景は以下の2つに大別される。

①IFNを抗炎症剤として用いて、ALT値の持続正常化、肝線維化進展抑止を目指す。②IFNには、

細胞増殖抑制効果があり、肝癌細胞にも作用して、その増殖を抑制する、アポトーシスを誘導する、新生血管発育を抑制する、癌抑制遺伝子であるp53を誘導するといった作用がある。①を治療目標とする場合には、ALT値を指標とし、②の場合には、AFPなどの腫瘍マーカーを指標として、それぞれの治療法の効果を評価する。本治療法でALT値が低下、正常化しない例においても、AFP値は低下し正常化する場合が多く、IFNが前癌状態にある肝細胞に働きかけて肝癌の発生を抑えていることが想定される。

具体的には、従来型のIFNは、通常使用量の半分から1/4を、週2~3回投与する。PEG-IFNも通常使用量(180 μ g)の半分から1/4量を2~4週間に1回投与する。投与量も少なく、投与間隔も長くなることから、IFNの副作用は軽微となる一方で、薬剤の安全性も高まり、また薬剤費用の負担も軽くなるという経済的なメリットも生まれる。ウイルス駆除を治療目的としないことから、患者が治療を続けることに疲れた場合や、1~2週間の旅行に出かける場合には、躊躇することなく治療を中止することが、この治療法のコツである。休薬によって体調が戻った場合や旅行から帰った場合に

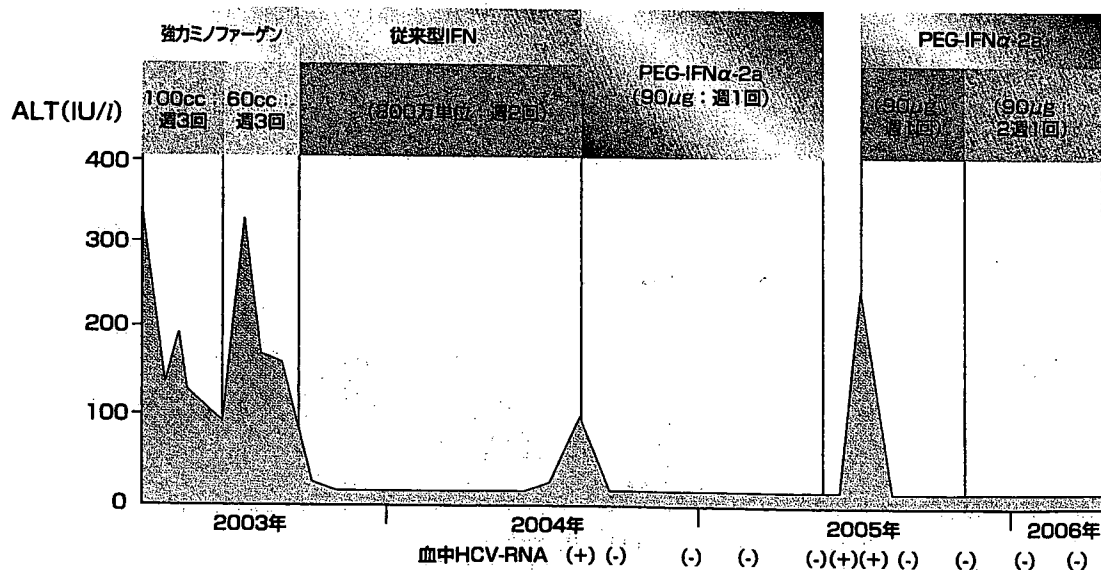


図2 70歳女性①

強力ミノファージェンからIFN少量長期へ移行後に、PEG-IFNを導入した例。PEG-IFNを2週に1回の使用でもALT値は正常化し、血中HCV-RNA陰性化が持続している。

(国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター治療研究部)

は治療を再開する。また、従来型のIFNでは、在宅自己注射が2005年4月に承認されている。年余に渡って治療を行うことで肝線維化の進展抑制、発癌抑止等の治療効果が期待できる(図2,3)。

これからの肝疾患診療体制 一かかりつけ医と肝疾患専門 医療機関との医療連携

厚生労働省は、平成19年1月26日付けで「都道府県における肝炎検査後肝疾患診療体制に関するガイドライン」を公表した。そのガイドラインの中には、都道府県ごとに肝疾患診療ネットワーク(図4)を構築して肝疾患の医療連携を推進する、すなわち下記のようなことを実施するよう明記している。まず、各都道府県は、医師会、肝炎に関する専門医、関係市区町村や保健所等の関係者によって構成される肝炎診療協議会を設置する。同協議会では、各都道府県等の実情に応じて、①要

診療者に対する保健指導、②かかりつけ医と専門医療機関の連携、③高度専門的ないし集学的な治療を提供可能な医療機関の確保、④受診状況や治療状況等の把握、⑤医療機関情報の収集と提供、⑥人材の育成、等について必要な検討を行うとともに、関係者との連絡・調整を図る。平成19年度内に、肝炎診療協議会は、肝疾患診療連携拠点病院を原則1箇所、また2次医療圏ごとに肝疾患専門医療機関を指定する。

一方、筆者が、日々の日常診療の中で実感している肝疾患診療の現状と問題点を下記に箇条書きにすると、①肝疾患は自覚症状がないにもかかわらず、最終的には肝硬変、肝癌を合併することがある、②肝疾患の診断法と治療法は毎年急速に進歩しているも専門医でないとその全容の理解は困難である、③わが国にはC型肝炎感染者200万人、B型肝炎感染者130万人、合わせて330万人存在する、④それに比して日本肝臓学会認定の肝臓

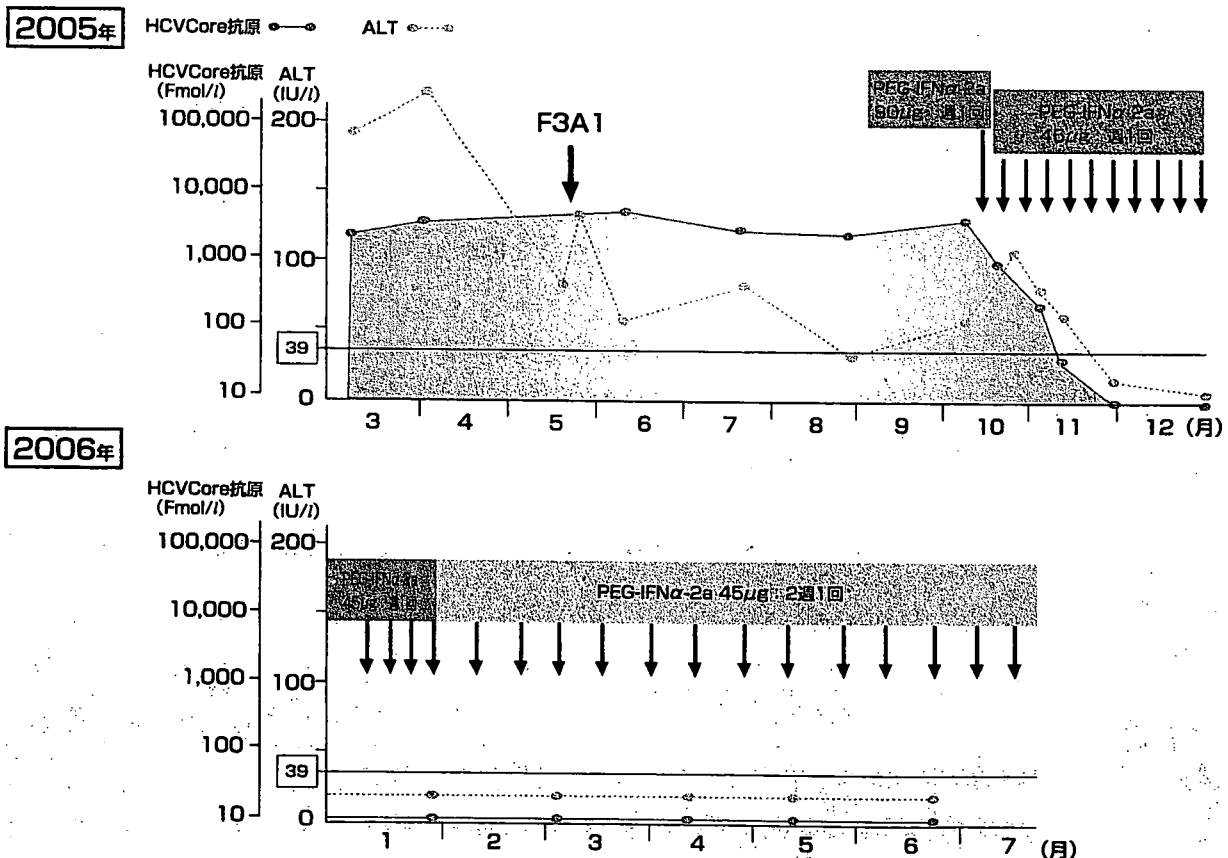


図3 70歳女性②

PEG-IFN90 μ gを投与したが、ふらふら感を訴えたことから、翌週からは45 μ gに減量した。副作用は軽減し継続投与可能となり、ALT値の正常化、HCV Core抗原の陰性化に至るも、体調が万全でないとの訴えがあることから45 μ g 2週に1回投与と投与間隔を延長した。変更後、自覚症状はほぼ消失するも、ALT値の正常化、抗ウイルス効果は同様に持続している。

(国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター治療研究部)

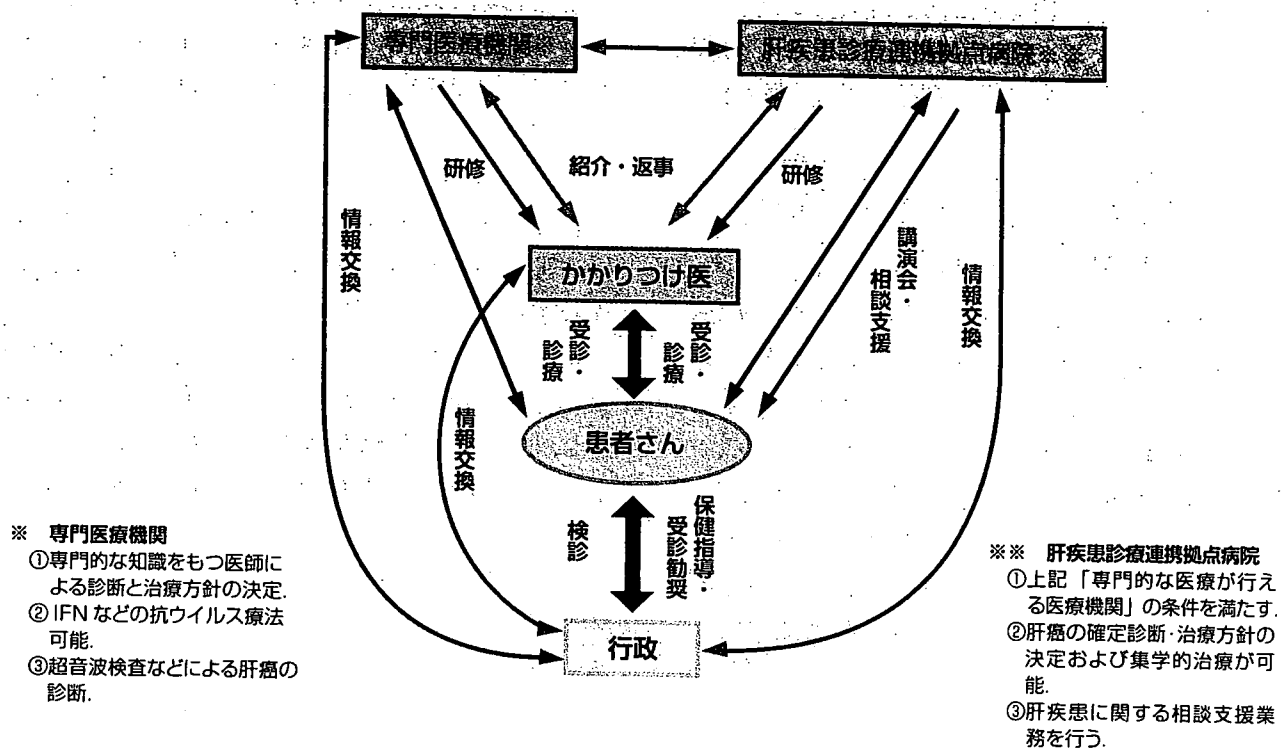


図4 都道府県における肝疾患診療ネットワーク(2007年から)

(全国C型肝炎診療懇談会報告書(厚生労働省, 2007)より改変)

専門医数は、平成19年10月末の時点で3,695人と少ない(一専門医当たり1,000人の肝炎患者)、⑤現在、肝疾患の多くは適切な診断と治療によって完治ないしコントロールが可能な疾患となりつつある、などが挙げられる。

上記のような日本の医療状況の中で、肝疾患患者が理想的な医療を享受するためには、かかりつけ医と肝疾患専門医療機関の医療連携が重要である。肝疾患患者は、普段の診療、IFNを含む投薬

等はかかりつけ医が行い、病状の正確な診断、治療方針決定などは専門医療機関で行う。病状が安定している場合でも1年に1回は専門医療機関に診察を依頼し、病態や治療方針を確認することが望ましい。

BASIC STUDIES

NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analogue, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cellsMotoyuki Kohjima¹, Munechika Enjoji¹, Nobito Higuchi¹, Kazuhiro Kotoh¹, Masaki Kato¹, Ryoichi Takayanagi¹ and Makoto Nakamuta^{1,2}¹ Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan² Department of Gastroenterology, National Hospital Organization Kyushu Medical Center, Fukuoka, Japan**OnlineOpen:** This article is available free online at www.blackwell-synergy.com**Keywords**cyclosporine analogue – hepatic fibrosis – hepatic stellate cell – NIM811 – TGF- β **Correspondence**Munechika Enjoji, MD, PhD, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan
Tel: +81 92 642 5282
Fax: +81 92 642 5287
e-mail: enjoji@intmed3.med.kyushu-u.ac.jp

Received 13 April 2007

accepted 4 July 2007

DOI:10.1111/j.1478-3223.2007.01560.x

Abstract

Background/Aims: A recent decrease in patient survival has been reported among hepatitis C virus (HCV)-infected liver transplant recipients and this may be attributable to progression of fibrosis. We reported previously that cyclosporine suppressed the proliferation of, and collagen production in, hepatic stellate cells (HSCs). Here, we investigated the effects of NIM811, a cyclosporine analogue, on cell growth, collagen production and collagenase activity in HSCs. **Methods:** Rat HSCs and human HSC-derived TWNT-4 cells were cultured for the study. The expression of collagen, matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and collagenase activity was evaluated. Cell proliferation and apoptosis were measured. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), Smad2 and Smad3 was evaluated. The expression of the tumour growth factor- β (TGF- β)-receptor and Smad7 genes was also evaluated. **Results:** NIM811, as well as cyclosporine, suppressed the transcription and synthesis of collagen and stimulated the production of MMP-1 with a concomitant enhancement of collagenase activity, although it did not change the expression of TIMP-1. NIM811 inhibited proliferation without induction of apoptosis. In the MAPKs and TGF- β signalling pathways, NIM811 enhanced the phosphorylation of JNK and p38, but not extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and suppressed the phosphorylation of Smad2 and Smad3, accompanied by increased Smad7 transcription and decreased TGF- β -receptor transcription. **Conclusion:** These findings demonstrate that NIM811 not only suppresses collagen production and proliferation but also increases collagenase activity. These effects are accompanied by inhibition of TGF- β signalling pathways.

In liver transplantation, a significant decline in patient survival, caused by rapid progression to decompensated graft cirrhosis, is an important clinical issue for hepatitis C virus (HCV)-positive patients, whereas there has been an improvement in the survival of HCV-negative patients (1–5). Progression to cirrhosis has been estimated to occur in up to 30% of patients at 5 years after transplantation, and the rate of disease progression has been greater in patients who under-

went transplantation in recent years compared with those who underwent transplantation a longer period of time ago (1, 2, 4). Several variables, including donor age, degree of immunosuppression and viral load, are implicated in the recent increase in progression (2, 3). Indeed, Berenguer *et al.* (3, 5) reported that HCV-infected patients who received immunosuppressive therapy with cyclosporine were less likely to develop graft cirrhosis than those who received tacrolimus, indicating that the choice of calcineurin inhibitor may influence disease progression (6).

Hepatic stellate cells (HSCs) are nonparenchymal liver cells that have a characteristic stellate morphology

Re-use of this article is permitted in accordance with the Creative Commons Deed, Attribution 2.5, which does not permit commercial exploitation.

and reside in the perisinusoidal space of Disse (7). Following liver injury, HSCs undergo transdifferentiation to an activated myofibroblastic phenotype and express α -smooth muscle actin. Activated HSCs then proliferate and produce extracellular matrices (ECM) such as collagens (7, 8). Previously, we evaluated the effects of immunosuppressive drugs, such as cyclosporine and tacrolimus, on HSCs. Cell proliferation and collagen production were suppressed by cyclosporine but not by tacrolimus, indicating that cyclosporine potentially has an anti-fibrogenic effect (9).

Cyclosporine is an immunosuppressive cyclic undecapeptide, and binds with nanomolar affinity to cyclophilins. The complex of cyclosporine and cyclophilin A inhibits calcineurin, a calcium-dependent phosphatase that regulates the expression of various cytokine genes in activated T-lymphocytes (10–12). NIM811 is a four-substituted cyclosporine that does not bind to cyclophilin A and therefore lacks immunosuppressive activity; however, it retains the ability to bind other cyclophilins, such as cyclophilin B (13). Recently, NIM811, as well as cyclosporine, showed a suppressive effect on HCV at the RNA and protein levels in an HCV subgenomic replicon cell culture system (14). In this study, we investigated the effects of NIM811 on proliferation, collagen production and collagenase activity in HSCs *in vitro*. We demonstrated that NIM811 not only suppressed proliferation and collagen production but also enhanced collagenase activity in HSCs, indicating that NIM811 is a potential candidate for anti-fibrosis therapy.

Materials and methods

Cell culture

Hepatic stellate cells were isolated from the liver of male Wistar rats by sequential *in situ* perfusion with collagenase and digestion with pronase, followed by centrifugation in a double-layered (17%/11.5%) metrizamide solution (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA), as described previously (15). HSCs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% foetal calf serum (FCS). The experiments described in this study were performed on cells between the third and fourth serial passages. Because commercial kits for the measurement of mouse or rat matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were not available, we used TWNT-4 cells, a human cell line derived from HSCs (16), to evaluate the effects of NIM811 on MMP-1 and TIMP-1. TWNT-4 cells were cultured in DMEM with 10% FCS as reported previously (16). NIM811 was donated by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland). NIM811 was dissolved in DMEM and added to the cultures. The cell viability of HSCs was

more than 90% under serum-free conditions for 24 h in the presence of 2 mM NIM811 under serum-free conditions.

Type I collagen assay

Cultured HSCs were incubated in a serum-free medium in the presence or absence of NIM811 for 24 h. Type I collagen was determined in culture media by ELISA as described previously (17). Anti-rat type I collagen antibody (LSI, Tokyo, Japan) was used as the primary antibody and peroxidase-conjugated goat-anti-rabbit IgG (Organon Teknika Corporation, Durham, NC, USA) was used as the secondary antibody. Rat tail tendon collagen type I (Advance Biofactures Corporation, Lymbrook, NY, USA) was used as the standard.

Matrix metalloproteinase 1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and collagenase assay

Cultured TWNT-4 cells were incubated in a serum-free medium in the presence or absence of NIM811 for 24 h. MMP-1 and TIMP-1 productions were determined in culture media by ELISA using a Biotrak ELISA system for human MMP-1 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and an hTIMP-1 kit (Daiichi Fine Chemical Co. Ltd, Toyama, Japan) respectively (18). Active MMP-1 and pro-MMP-1 in culture media were determined using an MMP-1 Biotrak Activity Assay System (Amersham) (18).

Analysis of gene expression using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Total RNA was prepared with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) from TWNT-4 cells that were maintained in either the presence or absence of NIM811 in 10% FCS for 24 h. cDNA was synthesized from 1.0 μ g RNA with GeneAmpTM RNA PCR (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) using random hexamers. Real-time PCR was performed using LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green 1 (Roche, Tokyo, Japan) as described previously (19). The reaction mixture (20 μ L) contained LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green 1, 4 mM MgCl₂, 0.5 μ M of the upstream and downstream PCR primers and 2 μ L of the first-strand cDNA as a template. To control for variations in the reactions, all PCRs were normalized against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. The primers used were as follows: 5'-AGGGTGAGACAGGCGAACAG-3' (forward primer) and 5'-CTCTTGAGGTGGCTGGGGCA-3' (reverse primer) for human type I collagen α 1 chain (GenBankTM accession number NM000088) (20);

5'-GATCATCGGGACAACTCTCCT-3' (forward primer) and 5'-TCCGGGTAGAAGGGATTGTG-3' (reverse primer) for MMP-1 (GenBankTM accession number NM002421) (21); 5'-TTCTGCAATTCCGACCTCGT-3' (forward primer) and 5'-TCCGTCCACAAGCAATGAGT-3' (reverse primer) for TIMP-1 (Ref. 3; GenBankTM accession number NM003254) (22); 5'-GGATCTCAGGCATTCTCGG-3' (forward primer) and 5'-CAGTATGCCACCACGCACCA-3' (reverse primer) for Smad7 (23); and 5'-GGCCGTTTGTATGTG CACCCTC-3' (forward primer) and 5'-GGGCGATCTAATGAAGGGTCC-3' (reverse primer) for TGF- β -receptor I (TGF- β -RI) (24).

Analysis of bromodeoxyuridine incorporation

Hepatic stellate cell incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) was measured using a cell proliferation ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) as described previously (25). Briefly, subconfluent HSCs were serum starved for 24 h. They were then washed with DMEM and incubated for 24 h with BrdU in DMEM with 10% FCS in the presence or absence of NIM811. After labelling the cells with BrdU, cellular DNA was digested and incubated with the anti-BrdU antibody conjugated with peroxidase. BrdU incorporation was estimated by measuring the fluorescence intensity of the supernatant at 450 nm (excitation) and 690 nm (emission).

Analysis of apoptosis

Hepatic stellate cells were maintained in either the presence or absence of NIM811 under serum-free conditions for 24 h. Cells were fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde/PBS at room temperature, and permeabilized for 5 min in PBS containing 0.2% Triton X-100 at 4°C. Cells were then stained with Hoechst 33342 and analysed by the terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP nick end labeling method using an *in situ* Cell Death Detection Kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. The samples were visualized with an LSM 510 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). At least 100 cells from three independent experiments and from three different cell preparations were counted for each condition.

Western blot analysis for phospho- and nonphospho-mitogen-activated protein kinases

Western blot analysis was basically performed essentially as described previously (26). After starving HSCs for 24 h, they were treated with or without NIM811 for

2 h or mock treated. Whole-cell lysates containing 1×10^7 TWNT-4 cells were prepared in 100 mL sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. Protein lysates were subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) and probed with the primary antibodies for extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) mitogen-activated protein kinase (MAPK), phospho-ERK1/2 MAPK (Thr202/Tyr204), Jun N-terminal kinase (JNK), phospho-JNK (Thr183/Tyr185), p38 MAPK or phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Antibody binding was detected using peroxidase-linked anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) as the secondary antibody. The blots were developed using ECL-plus (Amersham Pharmacia Biotech) to visualize the antibodies. The levels of ERK1/2 MAPK, phosphorylated-ERK1/2 MAPK, JNK, phosphorylated-JNK, p38 MAPK and phosphorylated-p38 MAPK were quantified by densitometry using an optical scanner system. For comparison, the ratios of phosphorylated ERK1/2, JNK and p38 MAPK to non-phosphorylated ERK1/2, JNK and p38 MAPK, respectively, were calculated from the densitometric data.

Western blot analysis for phospho- and nonphospho-Smad2 and Smad3

Western blot analysis was performed as described above, probed with the primary antibody for Smad2, phospho-Smad2 (Thr/Tyr), Smad3 or phospho-Smad3 (Thr/Tyr) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). For comparison, the ratios of phosphorylated Smad2 and Smad3 to nonphosphorylated Smad2 and Smad3, respectively, were calculated from the densitometric data.

Statistical analysis

All results are shown as the mean \pm SEM. Comparisons were made using one-way ANOVA, followed by Scheffé's test or the Mann-Whitney test.

Results

Effects of NIM811 on type I collagen accumulation, matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production and collagenase activity

To assess the effect of NIM811 on ECM production by HSCs, we determined type I collagen concentrations in culture media after adjusting the number of rat HSCs. Treatment of the cells with increasing concentrations

of NIM811, as well as cyclosporine, led to a concentration-dependent suppression of collagen accumulation; 0.5 mM NIM811 reduced collagen accumulation by approximately 50% (Fig. 1). As reported previously (9), cyclosporine at the clinically relevant concentration of 0.125 mM (150 ng/mL) reduced collagen production by approximately 50%, whereas tacrolimus at the clinically relevant concentration of 12.5 nM (10 ng/mL) did not reduce collagen production significantly (Fig. 1).

Because collagenase activity affects accumulation of type I collagen, we evaluated the effects of NIM811 on collagenase activity in TWNT-4 cells. NIM811 led to a concentration-dependent increase in collagenase ac-

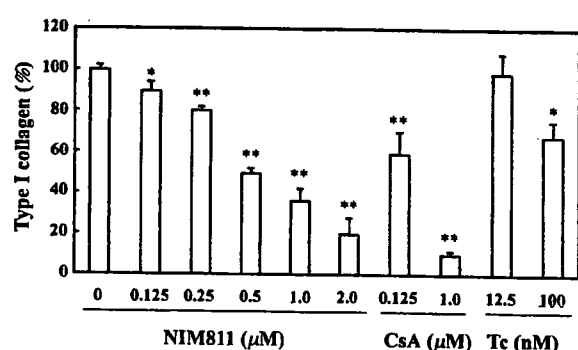


Fig. 1. Effects of NIM811, cyclosporine (CsA) and tacrolimus (Tc) on the accumulation of type I collagen in rat hepatic stellate cells (HSCs). NIM811, as well as cyclosporine, caused a concentration-dependent inhibition of type I collagen production. In contrast, tacrolimus did not show these suppressive effects at a clinically relevant concentration (i.e. 12.5 nM, equivalent to 10 ng/mL). The data represent mean \pm SEM from five independent experiments. *and **Statistically significant differences ($P < 0.05$ and < 0.01 respectively) compared with HSCs in the absence of NIM811, CsA and Tc.

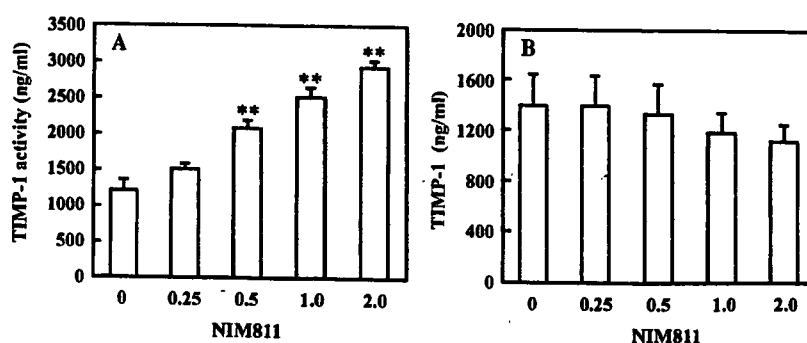


Fig. 2. Effects of NIM811 on matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) activity (collagenase activity) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in TWNT-4 cells. NIM811 caused a concentration-dependent enhancement of MMP-1 activity (collagenase activity) (A). NIM811 also tended to reduce TIMP-1 production in a concentration-dependent manner (B). The data represent mean \pm SEM from five independent experiments. *and **Statistically significant differences ($P < 0.05$ and < 0.01 respectively) compared with hepatic stellate cells (HSCs) in the absence of NIM811.

tivity (active MMP-1); in the presence of 0.5 mM NIM811, collagenase activity increased roughly two-fold (Fig. 2A). Because collagenase activity is regulated by the balance between MMP-1 and TIMP-1, we also evaluated TIMP-1 production in TWNT-4 cells. NIM811 tended to reduce TIMP-1 production in a concentration-dependent manner; however, NIM811 did not reduce TIMP-1 production significantly, even at a concentration of 2.0 mM (Fig. 2B).

Effects of NIM811 on gene expression of type I collagen, matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1

We used RT-PCR to evaluate the effects of NIM811 or cyclosporine on the mRNA levels of type I collagen, MMP-1 and TIMP-1. The expression of type I collagen was reduced by roughly 30% in the presence of 0.5 mM NIM811 (Fig. 3A). In contrast, 0.5 mM NIM811 increased the expression of MMP-1 nearly two-fold (Fig. 3B) but did not affect that of TIMP-1 (Fig. 3C). These results indicated that the effects of NIM811 on gene expression were similar to its effect on protein production.

Effect of NIM811 on cell proliferation and apoptosis

Bromodeoxyuridine incorporation was measured to investigate the effect of NIM811 on cell proliferation. Quantitative analysis showed that 2.0 mM NIM811 treatment decreased new DNA synthesis by nearly 30%, although treatment with lower concentrations had a reduced effect (Fig. 4). Next, we evaluated the effects of NIM811 on apoptosis; even in the presence of 2 mM NIM811, little apoptosis was observed (data not shown).

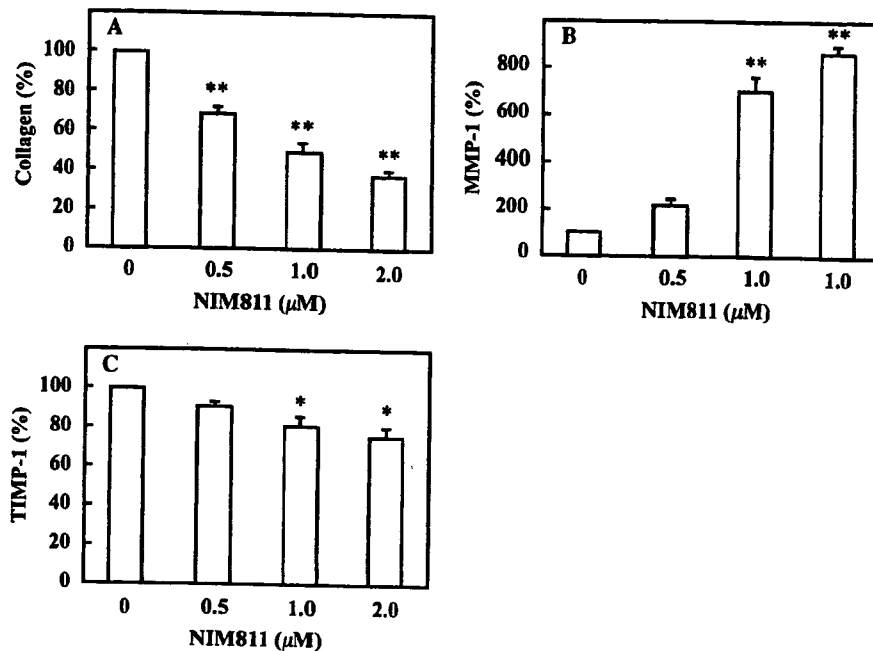


Fig. 3. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of type I collagen, matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA expression. Total RNA was extracted from hepatic stellate cells (HSCs) treated with NIM811 (0.5, 1 or 2 mM) or mock treated. Samples were analysed by real-time RT-PCR and all PCR reactions were normalized for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. NIM811 reduced the expression of type I collagen (A) and TIMP-1 (C) but it enhanced the expression of MMP-1 (B). The ratio of expression in the absence of NIM811 was used as a control (100%). The data represent mean \pm SEM from three independent experiments. *and **Statistically significant differences ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively) compared with HSCs in the absence of NIM811.

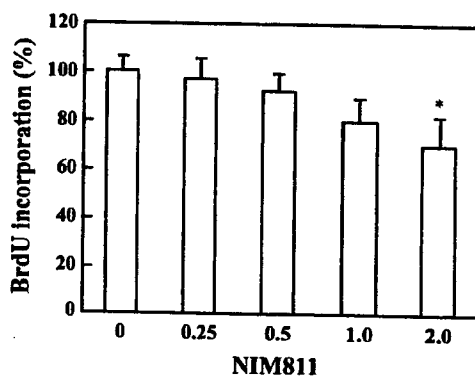


Fig. 4. Effects of NIM811 on BrdU incorporation into hepatic stellate cells (HSCs). NIM811 (2.0 mM) decreased BrdU incorporation in cells by nearly 30% compared with untreated cells, although treatment with a lower concentration did not. The data represent mean \pm SEM from five independent experiments. *Statistically significant difference ($P < 0.05$) compared with HSCs in the absence of NIM811.

Effects of NIM811 on MAPKs signalling pathways

Because cell growth and the expression of genes involved in the process of cell growth are widely regulated through MAPK signal cascades, we assessed

the effects of NIM811 on MAPK activity, including ERK1/2, JNK and p38. Treatment with NIM811 significantly enhanced the phosphorylation of JNK and p38 MAPK in a concentration-dependent manner, but did not enhance the phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 5A–C). NIM811 at a concentration of 0.5 mM enhanced the phosphorylation of JNK and p38 MAPK by nearly 3.6- and 2.3-fold respectively (Fig. 5B and C).

Effects of NIM811 on tumour growth factor- β signalling pathways

Because TGF- β signal cascades through Smad2 and Smad3 strongly regulate the expression of the type I collagen gene (27), we evaluated the effects of NIM811 on the phosphorylation of Smad2 and Smad3. Treatment with NIM811 significantly suppressed the phosphorylation of Smad2 and Smad3 in a concentration-dependent manner; 0.5 mM NIM811 suppressed the phosphorylation of Smad2 and Smad3 by nearly 70 and 60% respectively (Fig. 6A and B). Next, we evaluated the expression of Smad7, which negatively regulates TGF- β signalling pathways by inhibition of TGF- β -RI phosphorylation (28). 0.5 mM NIM811

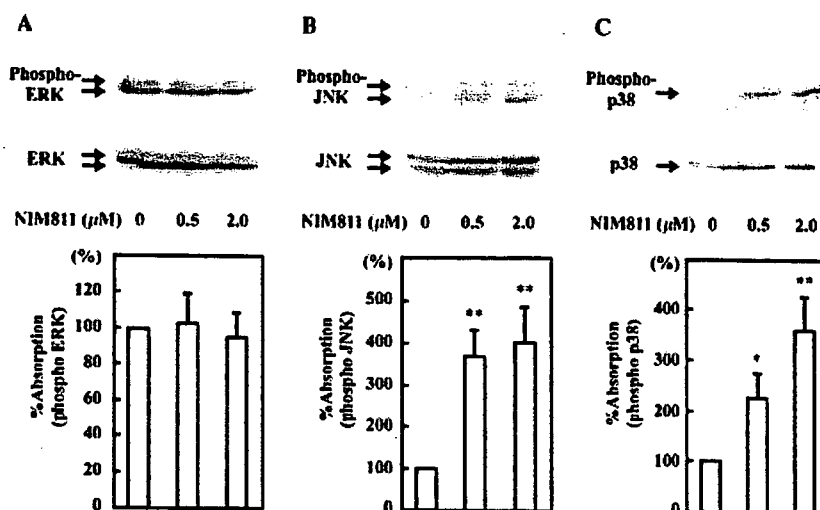


Fig. 5. Western blot analysis of phosphorylated and nonphosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) (A), JNK (B) and p38 (C). NIM811 enhanced the phosphorylation of JNK and p38, but not ERK1/2. Each figure is representative of three independent experiments. Band intensities were measured to determine the ratios of phosphorylated to nonphosphorylated ERK1/2, JNK and p38. The ratio of phosphorylation in the absence of NIM811 was used as a control (100%). The values shown are the mean \pm SEM of triplicate determination. * and ** Statistically significant differences ($P < 0.05$ and < 0.01 respectively) compared with hepatic stellate cells (HSCs) in the absence of NIM811.

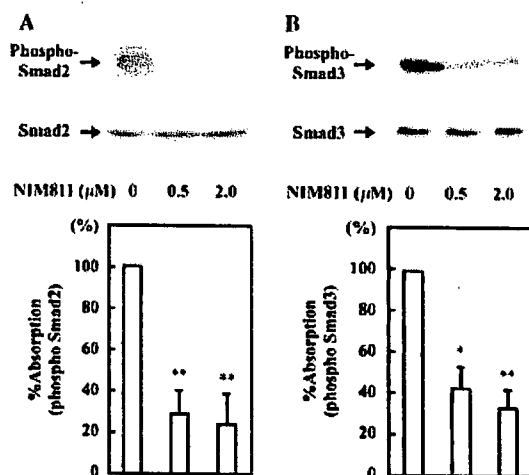


Fig. 6. Western blot analysis of phosphorylated and nonphosphorylated Smad2 and Smad3. NIM811 strongly suppressed the phosphorylation of Smad2 (A) and Smad3 (B). Each figure is representative of three independent experiments. Band intensities were measured to determine the ratios of phosphorylated to nonphosphorylated Smad2 and Smad3. The ratio of phosphorylation in the absence of NIM811 was used as a control (100%). The values shown are the mean \pm SEM of triplicate determination. * and ** Statistically significant differences ($P < 0.05$ and < 0.01 respectively) compared with hepatic stellate cells (HSCs) in the absence of NIM811.

enhanced the expression of Smad7 nearly two-fold (Fig. 7A) and it suppressed that of TGF- β -RI by nearly 50% (Fig. 7B).

Discussion

A recent study by Berenguer *et al.* (3) demonstrated that HCV-infected patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine were less likely to develop graft cirrhosis than those treated with tacrolimus. We reported previously that cyclosporine at the clinically relevant concentration of 0.125 mM (150 ng/mL) significantly reduced collagen production in HSCs, while tacrolimus at the clinical concentration of 12.5 nM (10 ng/mL) did not (9). In this study, we demonstrated that NIM811 (0.125 mM), as well as cyclosporine, produced a concentration-dependent suppression of collagen accumulation (Fig. 1). We also found that this suppression was regulated at least as far upstream as the transcriptional level because treatment with NIM811 suppressed collagen gene expression. Collagen accumulation, in addition to being determined by the rate of collagen production, is also regulated by collagenase activity, specifically, by the balance between MMP-1 and TIMP-1. We found that treatment of the cells with NIM811 increased collagenase activity, accompanied by stimulation of the transcription and synthesis of MMP-1 and weak suppression of the expression of TIMP-1 (Figs 2 and 3).