

含む plasmid (pBFH2) の RT 領域を含む配列 (nt 179-1068) を adefovir 耐性患者血清から増幅した同配列と入れ替えた。さらに、site-directed mutagenesis 法によりこの患者に認められた変異である rtL180M, rtT184S, rtA200V, rtS202C, rtM204V, rtN236T を種々の組み合わせで野生型塩基あるいは別の塩基に置換した。

細胞培養：ヒト肝癌細胞株である HepG2 を 24 well plate に 1.25×10^5 cells/well の濃度で撒き、375 ng の plasmid DNA を transfection した。4 時間後、PBS で 2 回洗い、500 μ l の medium と種々の濃度の adefovir を加え、4 日後の培養上清を回収した。

Real-time PCR：Adefovir の IC50 濃度を決定するため、real-time PCR を行った。5 μ l の培養上清を 5 unit の DNase I と 2 時間反応させて plasmid DNA を消化し、EDTA で反応を停止させた。DNA を抽出し、200 μ l の DNA 溶液中の 10 μ l を LightCycler system を用いた real-time PCR により HBV DNA を定量した。

C. 研究結果

患者背景：男性 20 例、女性 8 例、年齢の中央値は 53.5 歳。HBV の genotype は A が 1 例 (4%)、B が 7 例 (25%)、C が 19 例 (68%) であり、8 例 (29%) が肝硬変、7 例 (25%) が肝細胞癌、17 例 (61%) が HBeAg 陽性であった。HBV の RT 領域の YMDD モチーフをダイレクトシーケンス法にて決定すると、YIDD が 14 例 (50%)、YVDD が 11 例 (39%)、YIDD+YVDD が 2 例 (7%) であり、1 例は YMDD モチーフの変異を認めなかった。Genotype B と C の患者の背景には有意差を認めなかった。

Lamivudine、adefovir 併用療法の効果：Lamivudine 耐性患者に対して adefovir 併用療法を行った (観察期間中央値 47 ヶ月)。全ての患者が virological breakthrough を起こすまで治療が継続された。HBV DNA 陰性化 (2.6 log copies/ml 未満) 率は 6, 12, 24, 36, 48 ヶ月でそれぞれ 36, 63, 80, 86, 92% であった (表 1)。ALT の正常化率は 6 ヶ月で 57%、12 ヶ月で 70%、24 ヶ月で 84%、36 ヶ月で 82%、48 ヶ月で 77% であった。Genotype B と C で比較すると、genotype B において HBV DNA 正常化、ALT 正常化ともに良好な傾向が得られた (図 1)。累積 HBV DNA 陰性化は genotype B で有意に高かった ($P=0.0496$) が、ALT 正常化については有意差は認められなかった。HBeAg の有無の影響については HBeAg 陰性例で良好である傾向は認めるものの、有意差には至らなかった。17 例の HBeAg 陽性患者において、HBeAg 消失は 6, 12, 24, 36, 48 ヶ月で 6, 24, 25, 62, 88% に認められた。HBsAg の消失が得られた例はなかった。

36 ヶ月以上併用療法を受けた 22 症例のうち、3 例は HBV DNA の陰性化が得られな

かった。うち 1 例は 54 ヶ月後に virological breakthrough を生じた。いずれも biochemical breakthrough は起こさなかった。

Lamivudine+adefovir 耐性患者の臨床経過：53 歳男性、2002 年 4 月に HBeAg 陽性 B 型肝炎硬変に対して lamivudine 投与が開始された。HBV の genotype は C であった。2003 年 3 月には breakthrough hepatitis (HBV DNA >7.6 log copies/ml、ALT 236 IU/l) を生じ、6 月より adefovir の併用投与が開始された。その後 HBV DNA は徐々に低下し、3 年後には 2.6 log copies/ml 未満となった。しかしながら、4 年後 (2007 年 12 月) に virological breakthrough (HBV DNA 4.3 log copies/ml) を生じた。肝硬変であったため、ALT の上昇が認められる前に tenofovir を lamivudine と併用して投与した。2 ヶ月後には HBV DNA は陰性化し、20 ヶ月後の現在まで virological breakthrough は認められていない。

Lamivudine+adefovir 耐性患者に認められた RT 領域の変異：Adefovir 投与開始前、adefovir 投与開始 30 ヶ月後、viral breakthrough 時 (adefovir 投与開始 54 ヶ月後) の 3 ポイントの血清を用いて HBV の RT 領域の塩基配列を direct sequence 法にて決定した。Lamivudine 耐性変異である rtM204I が adefovir 投与後に rtM204V に変化し、rtL180L/M の混合型変異が rtL180M に変化していた。Adefovir 耐性変異として知られている rtN236T は viral breakthrough 後に混合型変異 (rtN236N/T) として出現していた。注目すべきこととして、これまで adefovir 耐性変異としては報告のない rtA200V という変異も breakthrough 後に混合型変異 (rtA200V/A) として出現していた。PCR 産物をクローニングすると (表 2)、rtA200V の変異は 63% に認められたが、rtN236T は 25% にすぎなかった。さらに、rtT184S や S202C といった entecavir 耐性変異として知られているものが少数のクローンに認められた。これらの変異の組み合わせを検討すると (図 2)、adefovir 投与 30 ヶ月後には 100% のクローンが rtL180M+M204V であったが、breakthrough 後にはこれらの変異に加えて rtT184S, A200V, S202C, N236T が出現していた。

HBV 変異の複製効率に与える影響：今回の耐性患者に認められた変異の組み合わせのある HBV の複製効率を検討した (表 3)。既報の通り、lamivudine 耐性変異である rtM204I や rtL180M+M204V は複製効率を有意に低下させた。rtL180M+M204V に加わった変異としては rtA200V のみが複製効率が回復した。rtN236T はさらに複製効率を低下させたが、その低下を rtA200V は回復させることはできなかった。次に、変異の組み合わせと adefovir に対する感受性について、IC50 を計算して検討した。Lamivudine 耐性変異である rtM204I や rtL180M+M204V は adefovir

に対しても弱い耐性を示した。rtL180M+M204Vに比べると、さらにrtA200VやS202Cが存在すると有意に高い耐性を示した。患者血清のクローン解析と合わせて考慮すると、rtA200VはrtL180M+M204Vとともに存在するとlamivudine+adefovir併用療法への耐性の原因となりうると考えられた。

D. 考察

Lamivudineの効果とHBVのgenotypeの関係については報告があるが、adefovirとgenotypeの関係についてはまだ報告がなかった。本研究ではlamivudine+adefovir併用療法においてgenotype Cよりもgenotype Bでより早期のウイルス学的反応を示した。また、治療開始時のHBeAgの有無がlamivudine+adefovir併用の効果に影響するとの報告があるが、本研究では傾向はあるものの有意差には至らなかった。

Lamivudine+adefovir併用における耐性の出現は稀であることが報告されているが、本研究では1例がadefovir開始4年半後にvirological breakthroughを生じた。この患者のHBVにはRT領域にrtA200Vという特徴的な変異が認められた。この変異の薬剤耐性に対する影響は、lamivudine耐性変異がlamivudineに対して1000倍以上の耐性を示すような大きなものではなかったが、adefovirは腎毒性のために臨床用量が低く設定されており、変異の耐性度が低くても臨床的に大きな影響を与える可能性はあると考えられた。

本研究のlamivudine+adefovir耐性患者ではlamivudine+tenofovirの併用を行ったところHBV DNAは速やかに抑制された。In vitroの研究でtenofovirはadefovirと交差耐性を示すとの報告もあるが、adefovir耐性患者に対してtenofovirが有効であったとの報告が散見されている。本患者の経過もそれらの報告の結果を支持しているが、本邦ではtenofovirは保険適応となっておらず、このような症例に対する治療法の選択は今後の課題である。

E. 結論

本研究ではlamivudine耐性患者に対するadefovir併用療法はほとんどの患者に4年間は有効であることが示され、特にgenotype B

で有効であった。しかしながら、4年以上の経過で1例の耐性患者が見られ、既報のlamivudine耐性変異に加えてrtA200Vという変異が出現していた。さらにentecavir耐性変異のあるクローンも少数ながら出現しており、特にHBV DNAが十分に抑制できていない患者では長期治療に伴う多剤耐性株の出現リスクを考慮する必要があると考えられた。そのような症例では多剤耐性株の出現を防ぐためにより強力な薬剤が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Niitsuma H, Fukushima K, Yamagiwa Y, Shiina M, Kondo Y, Kakazu E, Tamai K, Obara N, Iwasaki T, Shimosegawa T. Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: Influence of hepatitis B virus genotype and resistant mutation pattern. *J Viral Hepat.* 2010 (in press).

2) Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Wakui Y, Kondo Y, Fukushima K, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced intracellular retention of a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis. *Virology.* 2009;395:202-9.

3) Inoue J. Factors involved in the development of fulminant hepatitis B: Are the mutations of hepatitis B virus implicated? *Hepatol Res.* 2009;39:1053-5.

4) Ueno Y, Sollano JD, Farrell GC. Prevention of hepatocellular carcinoma complicating chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:531-6.

5) Amarapurkar D, Han KH, Chan HL, Ueno Y. Application of surveillance programs for hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific Region. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:955-61.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

表 1. Lamivudine 耐性患者に対する中央値 47 ヶ月間における lamivudine+adefovir 併用療法に対する効果

Response	Months of treatment						
	0 (n = 28)	6 (n = 28)	12 (n = 27)	24 (n = 25)	36 (n = 22)	48 (n = 13)	60 (n = 7)
HBV DNA <2.6	0 (0)	11 (39.3)	15 (55.6)	20 (80.0)	19 (86.4)	12 (92.3)	6 (85.7)
HBV DNA 2.6-<5.0	1 (3.6)	15 (53.6)	11 (40.7)	5 (20.0)	3 (13.6)	1 (7.7)	1 (14.3)
HBV DNA ≥5.0	27 (96.4)	2 (7.1)	1 (3.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ALT normalization*	NA	16 (57.1)	19 (70.4)	21 (84.0)	18 (81.8)	10 (76.9)	6 (85.7)
HBeAg disappearance†	NA	1/17 (5.9)	4/17 (23.5)	4/16 (25.0)	8/13 (61.5)	7/8 (87.5)	4/5 (80.0)
Virological breakthrough	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14.3)

Values are shown as numbers of patients followed by percentages in parentheses. NA, not applicable. * ALT ≤35 IU/l.
 †Values are shown as numbers of patients/total followed by percentages in parentheses.

表 2. Lamivudine+adefovir 耐性患者の HBV RT 領域のクローン解析

	% of clones (no. of clones/total)		
	At the start of ADV	30 months after ADV	54 months after ADV
D131E	0	0	6 (3/48)
G134D	20 (4/20)	50 (10/20)	15 (7/48)
R153Q	15 (3/20)	0	0
L155P	0	0	2 (1/48)
L180M	10 (2/20)	100 (20/20)	100 (48/48)
T184S	0	0	4 (2/48)
A200V	5 (1/20)	0	63 (30/48)
S202C	0	0	6 (3/48)
M204I	90 (18/20)	0	0
M204V	10 (2/20)	100 (20/20)	100 (48/48)
V214A	0	50 (10/20)	19 (9/48)
L229W	25 (5/20)	0	0
N236T	0	0	25 (12/48)
S256I	5(1/20)	0	0

表 3. HBV 変異株の複製効率と adefovir 感受性

HBV mutants	HBV DNA ($\times 10^7$ log copies/ml) [*]	Fold replication [†]	IC ₅₀ (μ M) [*]	Fold resistance [†]
Wild type	13.60 \pm 3.50	1	0.42 \pm 0.06	1
M204I	2.17 \pm 0.38	0.16	0.87 \pm 0.2	2.07
L180M+M204V	4.38 \pm 0.77	0.32	0.73 \pm 0.06	1.74
L180M+T184S+M204V	5.98 \pm 0.80	0.44	0.91 \pm 0.04	2.17 [‡]
L180M+A200V+M204V	8.90 \pm 0.56	0.65 [‡]	1.09 \pm 0.12	2.60 [‡]
L180M+S202C+M204V	4.86 \pm 0.19	0.36	2.19 \pm 0.63	5.21 [‡]
L180M+M204V+N236T	0.88 \pm 0.68	0.07 [‡]	>10	>25
L180M+A200V+M204V+N236T	0.54 \pm 0.38	0.04 [‡]	>10	>25

*Values are expressed as means \pm SD of experiments performed in triplicate. [†](Mean value of the mutant)/(mean value of the wild type). [‡] $P < 0.05$ in comparison with the clone with rtL180M+M204V.

図 1. Lamivudine+adefovir 併用療法におけるウイルス学および生化学的効果

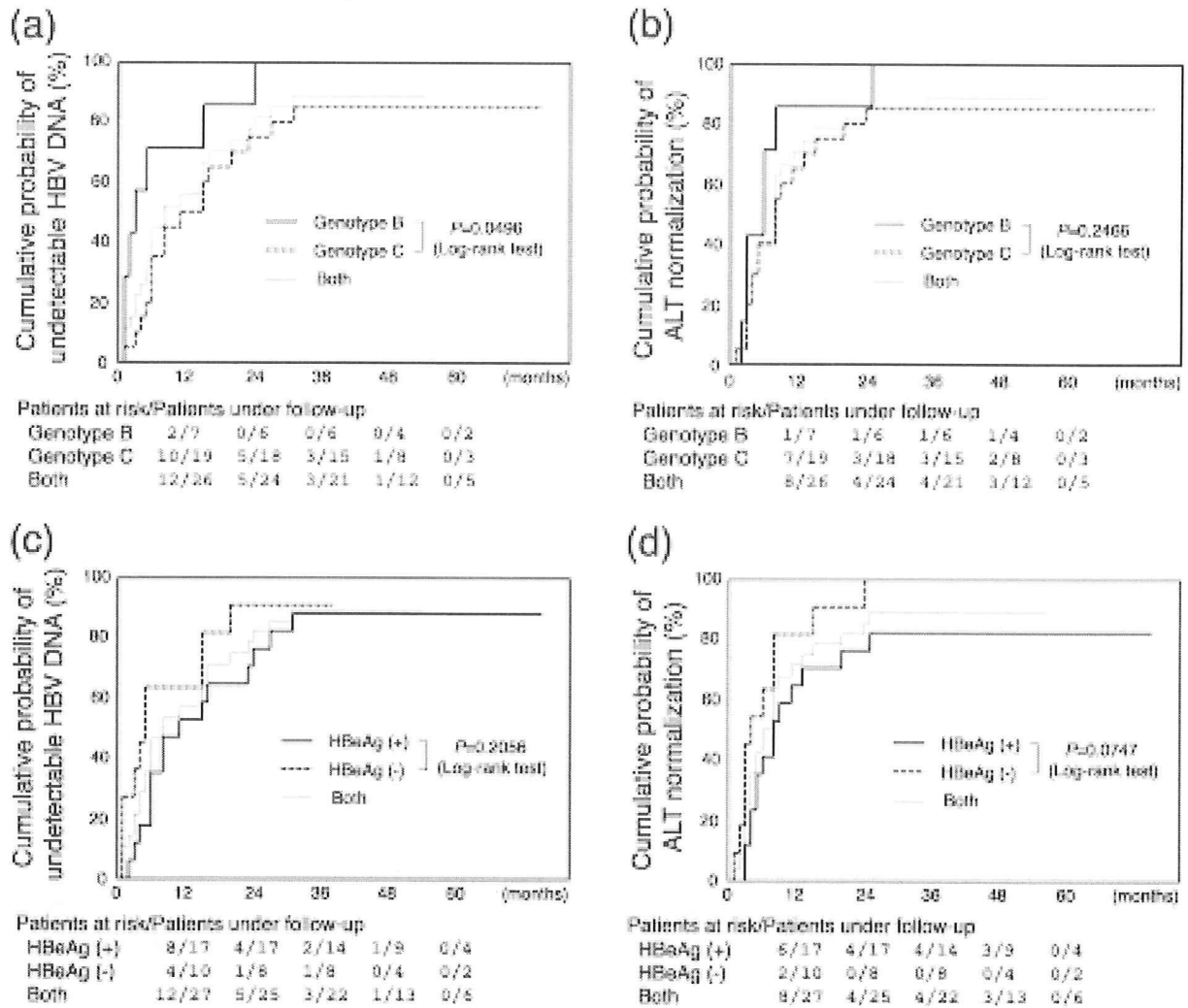
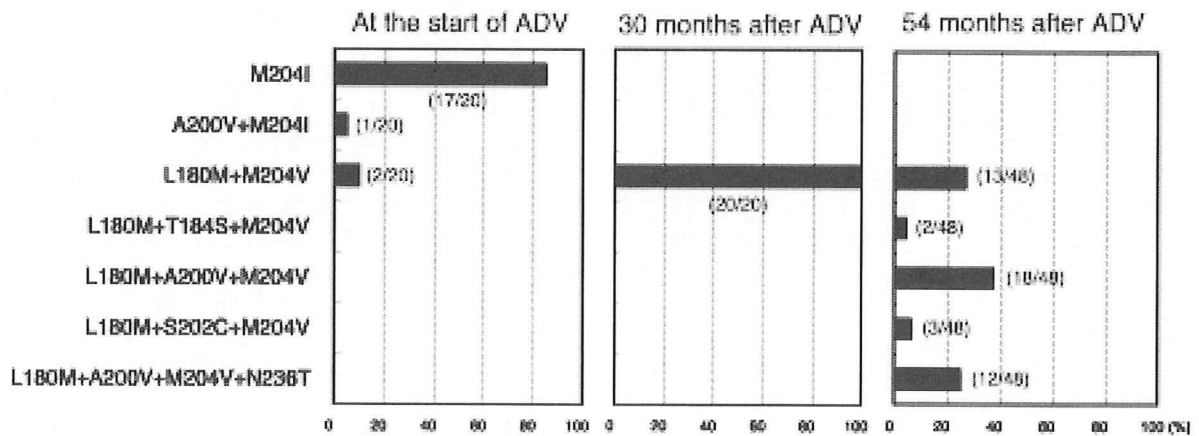


図 2. Lamivudine+adefovir 耐性患者の HBV のクローン解析



厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型肝炎無症候性キャリアの長期予後

研究分担者 四柳宏 東京大学大学院医学系研究科生体感染防御学 准教授

研究要旨：HCV 抗体陽性、HCV RNA 陽性、ALT 正常の無症候性キャリアの長期予後に関する検討を行った。対象は HCV RNA 陽性で 6 ヶ月以上 ALT が 30IU/L 以下を持続した 56 例、平均観察期間は 6.4 年である。56 例中 35 例は ALT が 30IU/L 以下を持続し、Persistent Normal ALT (PNALT)群に分類された。残りの 21 例は ALT が 31 IU/L 以上に上昇し、肝炎発症群に分類された。PNALT 群は肝炎群に比較して年齢が若かった。ALT が 20IU/L 未満で持続した 7 例（男性 2 名、女性 5 名）はすべて遺伝子型 1b の症例であった。ALT 30 以下で推移した 6 症例の肝組織は 5 例で慢性非活動性肝炎、1 例で非特異的反応性肝炎であり、慢性活動性肝炎の所見を呈した例はなかった。観察期間中 PNALT の状態を維持した症例ではすべて血小板は 15 万/mm³ 以上であった。従って血小板 15 万以上の PNALT では背景の慢性肝疾患の進展度、活動性は共に低かった。無症候性キャリアに対する現行のガイドラインは妥当なものと考えられた。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスキャリアの自然経過は、肝炎を発症する例から長期にわたり無症候性キャリアとして経過する例まで様々である。こうした ALT 持続正常値例 (HCV-infected patients with persistently normal ALT (PNALT) に対する治療ガイドラインが公表されたが、その自然経過の詳細はまだ不明である。今回、長期経過観察し得た、HCV 無症候性キャリアに関して検討を行った。

B. 研究方法

1990 年 1 月から 2009 年 10 月までに診療を行った HCV 抗体陽性、HCV RNA 陽性であり 6 か月以上 ALT 持続正常値 (30IU/L 未満) の 56 例を対象とした。

そのうち観察期間中 ALT 持続正常であった 35 例 (PNALT 群)、一年以上持続正常経過後、ALT が異常を呈した 21 例 (肝炎発症群) を比較した。PNALT 群に関してはさらに ALT 値で分類し経過をみた。

観察開始時の年齢、性、HCV genotype、AST/ALT、Hb、血小板、ヒアルロン酸、HCV RNA、肝組織所見などについて比較検討を行った。

C. 研究結果

【臨床背景】

男性/女性：17/39 例。平均観察期間 6.4 年。平均年齢 47.2 歳。平均 BMI 22.4。輸血歴あり/なし：20/30 例。HCV Genotype 1/Others: 42/14。AST 17.8。ALT 14.8 ヒアルロン酸 27.0。ヘモグロビン 13.5。血小板 20.4 万。HCV RNA (Amplacor monitor) 747 KIU/mL。肝生検は 13 例に対して実施された。

【ALT31 未満で推移した (PNALT) 症例とそれ以外の症例の比較】

ALT31 未満で推移した (PNALT) 35 例と肝炎を発症した 21 例の比較を行った。PNALT 例は肝炎発症例に比較して年齢が若かった (PNALT 44.6 歳、肝炎発症例 52.8 歳。p=0.026)。他の項目に関しては有意差を認めなかった。肝生検は PNALT 群の 7 例と肝炎発症群の 6 例で実施され、PNALT 群では NSRH (Non-Specific Reactive Hepatitis) 1 例、CPH (Chronic Persistent Hepatitis) 6 例であった。また、肝炎発症群では CPH (Chronic Persistent Hepatitis) 3 例、CAH (Chronic Active Hepatitis) 3 例であった。

【ALT20 未満で推移した PNALT 症例とそれ以外の PNALT 症例の比較】

ALT20 未満で推移した PNALT 症例 7 例とそれ以外の PNALT 症例 16 例を比較した。両群

に差を認めなかった。ALT20 未満で推移した PNALT 例に肝生検が行われたが、2 名とも Chronic Persistent Hepatitis の所見であった。

7 例（平均観察期間 8.3 年）は男性 2 例、女性 5 例であり、HCV Genotype は全例 1b であった。いずれも高ウイルス量であった。経過中に明らかな血小板やアルブミンの低下を認めた症例はなかった。

D. 考察

HCV の無症候性キャリアの実態に関しては 1999 年から 2000 年にかけて厚生労働省研究班で検討が行われ、初診時に ALT が正常（多くの施設では ALT40 以下）の場合 5 年の経過観察により約半数に肝機能異常が出現することが示されている。その後の京都府立医大の検討によれば ALT が正常の HCV キャリアの 30% に 5 年以内に ALT の異常が認められる。また、PNALT が持続する症例では血小板は 15 万以上であることが示されている。従って現在のガイドラインでは血小板 15 万未満の場合、慎重に経過観察可能であるとされている。

今回の我々の検討でも PNALT 正常例中平均観察期間 6.4 年で ALT の異常が出現した症例は 21 例（37.5%）であった。これまでの検討と整合する所見と考えられる。一方 PNALT の症例における血小板値は 14.2 万から 28.5 万であった。従って 15 万以上を経過観察の規準とする現行のガイドラインは妥当なものと考えられた。

ALT20 以下の症例 2 例に対して肝生検が行われたが、2 例とも Chronic Persistent Hepatitis の所見であった。従来から HCV の Healthy Carrier は非常に少ないことが指摘されているが、ALT の規準を厳しくしても同様の傾向であった。従って ALT が 20 IU/L 以下で推移する症例においても抗ウイルス療法の適応になるものと考えられる。このような症例では血小板の低下は緩徐であり、肝線維化の進展は軽度であるために、抗ウイルス療法が必須とまでは言えないが、知見を集積していく必要があると思われる。

E. 結論

血小板 15 万以上の PNALT も抗ウイルス療法の適応となるが、背景の慢性肝疾患の進展度、活動性は共に低く、慎重な経過観察も可能と思われた。無症候性キャリアに対する現行のガイドラインは妥当なものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Nishida K, Kato M, Sakai H, Takamatsu J,

Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis C in patients co-infected with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *Hepatol Res* 2009;39:657-663.

2) Ikeda H, Suzuki M, Okuse C, Yamada N, Okamoto M, Kobayashi M, Nagase Y, Takahashi H, Matsunaga K, Matsumoto N, Itoh F, Yotsuyanagi H, Koitabashi Y, Yasuda K, Iino S. Short-term prolongation of pegylated interferon and ribavirin therapy for genotype 1b chronic hepatitis C patients with early viral response. *Hepatol Res* 2009;39:753-759. 9:81:452-458.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

C型肝炎透析患者におけるトランスアミナーゼ値とUDCAの効果

研究分担者：桶谷 眞 鹿児島大学大学院消化器疾患・生活習慣病学 講師

研究要旨：HCV-RNA陽性透析患者(100例)およびHCV抗体陰性透析患者(154例)を対象に、3年間以上の観察期間内におけるALT値および血小板数の変化を解析した。観察期間内における血小板減少症（13万未満）および血小板数減少（20%以上）はHCV感染と有意に関連した。また、HCV-RNA陽性透析患者における観察開始時ALT値 ≥ 20 IU/Lは、血小板数減少に關与する有意に独立した因子であった(OR 2.339)。さらに、HCV-RNA陽性透析患者における観察期間内の平均ALT値 ≥ 15 IU/Lは、血小板減少症(OR 3.882)および血小板減少(OR 4.470)と有意に関連した。UDCA300mg/日を投与されたHCV-RNA陽性透析患者16例と非投与例84例を比較したところ、投与群ではALT、AST、GGTの有意な低下をみとめた。HCV-RNA陽性透析患者においてはALT値 ≥ 15 IU/Lは治療対象群と考えられ、IFN治療非適応例にはUDCA治療が有効と考えられた。

共同研究者

坪内博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 教授
井戸章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 准教授
宇都浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 講師

ナーゼが低値で、出血傾向により肝生検検査が回避されるなどから、肝炎の活動性、線維化進展の評価が困難で、治療導入はすすんでいない。

C型慢性肝炎においては、血小板数は線維化進展と密接に関連しており、臨床的に有用な指標である。我々はHCV-RNA陽性透析患者の長期経過観察期間内におけるALT値、血小板数の変化とその関連性を解析した。また、C型慢性肝炎に対する肝底護療法薬であるUDCA（ウルソデオキシコール酸）の治療効果を検討した。

A. 研究目的

輸血などの感染機会が多いことから、透析患者におけるHCV抗体陽性率は一般に高率で、全国統計では約12.4%と報告されている。透析療法の普及と予後の改善とともに近年、HCV抗体陽性透析患者からの肝硬変、肝細胞癌の発症が問題となっている。日本透析医学会の調査では年間1000人当たりの発症率は肝硬変8.57人、肝細胞癌3.87人であった。現在、C型慢性肝炎に対してはIFN単独療法やIFN+RIB併用療法などの抗ウイルス療法の有効性が報告されている。しかし、透析患者においてはトランスアミ

B. 研究方法

鹿児島県の主な17透析施設における透析患者、計2539例を対象とした。HCV抗体陽性は243例(9.6%)であった。HCV抗体陽性透析患者のうちHCV-RNA陽性を確認できたのは100例であった。うち16例はUDCA 300mg/日を6ヶ月以上投与された。残り84例は非治療群であった。

研究1. HCV-RNA陽性透析患者(以下HCV陽性群)84

例と HBs 抗原、HCV 抗体陰性透析患者(以下 HCV 陰性群)154 例について、最低 3 年間以上の観察期間における血小板数の変化を比較した。さらに HCV 陽性群を観察期間中の ALT 値(IU/L)の平均値より A 群:ALT <15、B 群:15 ≤ALT <20、C 群:20 ≤ALT <30、D 群: ≤30 の 4 群に分け、観察期間における血小板数の変化率を比較した。

研究 2. UDCA 300mg/日を投与された 16 例の HCV 陽性患者と 84 例の非投与 HCV 陽性患者の 6 ヶ月間における AST、ALT、GGT、血小板数の変化を比較した。

(倫理面の配慮)

本研究は鹿児島大学大学院の疫学研究等研究倫理委員会の承認を得て実施されている。

C. 研究結果

(1) 血小板減少に関与する因子

全対象者における血小板減少症(13 万未満)に関与する因子を単変量解析したところ、年齢、HCV 感染、AST、ALT、GGT が有意に関連した。さらに多変量解析では HCV 感染のみが有意な因子であった(OR 2.589、P=0.006)。また、血小板数減少(20%以上)に関連する因子について多変量解析を行ったところ、男性(OR 2.375、p=0.004)、HCV 感染(OR 2.339、p=0.005)が独立した有意な因子であった。平均 60.3 ヶ月の観察期間内での血小板減少率は HCV 陰性群 -5.3%に対し HCV 陽性群では -22.4%と有意に高かった(p<0.001)。

(2) HCV 陽性透析患者における血小板減少に関与する因子

HCV 陽性透析患者における血小板数減少(20%以上)に関与する因子を単変量解析したところ、男性と観察開始時の ALT 値 ≥20IU/L が有意であった。多変量解析では、観察開始時 ALT 値 ≥20IU/L のみが有意な因子であった(OR 3.318、p=0.016)。

(3) HCV 陽性透析患者における平均 ALT 値と血小板減少(図 1)

血小板減少率は A 群と比較し、平均 ALT 値 ≥15IU/L の B、C、D 群はいずれも有意に高かった。更に平均 ALT 値と GGT 値による多変量解析でも、平均 ALT 値

≥15IU/L は血小板減少症(13 万未満)に関与する有意に独立した因子であった(OR 3.882、p=0.018)。また、平均 ALT 値と性別の 2 因子による多変量解析でも、平均 ALT 値 ≥15IU/L は血小板数減少(20%以上)に関与する有意な因子であった(OR 4.470、p=0.005)。(4) UDCA 治療の効果(図 2)

UDCA 投与群における ALT、AST は投与 1 ヶ月で投与前値に比べ有意に低下し、6 カ月まで持続した。GGT も投与 2 カ月に投与前値より有意に低下し、以後持続した。一方、UDCA 非投与群では観察期間中に ALT、AST、GGT の有意な変化はみられなかった。血小板数は UDCA 投与群、非投与群いずれも有意な変化をみとめなかった。

D. 考察

C 型慢性肝炎においては、血小板数減少は線維化進展を反映する有用な指標である。また、透析患者においても血小板減少がみられることがあり、巨核球の減少、抗血小板抗体、尿毒素による血球減少などがその機序と考えられている。本研究では HCV 陰性群は観察期間中、-5.3%の血小板減少をみとめたのに対し、HCV 陽性群では -22.4%の有意な血小板減少を認めた。また HCV 感染は血小板減少症および血小板減少と関連する独立した因子であった。以上より HCV 感染は透析手技や透析期間の影響以上に血小板減少に関与することが明らかとなった。

また、HCV 陽性透析患者における観察開始時の ALT 値は、血小板減少症および血小板数減少に関与する独立した有意な因子であった。透析患者における ALT 値は非透析患者に比べ明らかに低値を示すが、これは VitB6 欠乏、尿毒素、UV 吸収物質などの影響が推測されている。観察期間中の ALT 値の平均値と血小板減少との関連性をみると、平均 ALT 値 ≥15IU/L の全ての群で 20%以上の血小板減少を示した。このことは ALT 値が基準範囲内であっても、肝炎の活動性の存在を反映しているものと考えられる。透析患者における ALT 値は肝臓関連死と密接に関連するとの報告があり、ALT 値 15IU/L 以上の HCV 陽性透析患者は治療対象群であると考えられる。

C型慢性肝炎では、抗ウイルス療法としてIFN治療が推奨されるが、透析患者においてはその導入が困難な場合が多い。UDCA治療はC型慢性肝炎に対してその有効性が確立されているが、本研究でもHCV陽性透析患者においてALT値、GGT値を有意に低下させた。HCV陽性透析患者における線維化抑制、発癌抑制などUDCA治療の長期的な効果については更なる検討が必要であるが、透析患者においても肝炎に対するUDCAの有効性が示唆された。

E. 結論

HCV陽性透析患者においては一般にALT値は低値であるが、観察開始時ALT値および観察期間中の平均ALT値は血小板減少と密接に関連していた。また、UDCAはHCV陽性群におけるALT値を有意に低下させた。HCV陽性透析患者においてはALT値15IU/L以上は治療対象群と考えられ、IFN治療非適応例にはUDCA治療が有効と考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida C, Uto H, Oketani M, Tokunaga K, Nosaki T, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A, Moriuchi A, Ido A, Tsubouchi H. Clinical significance of alanine aminotransferase levels and the effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2009 Nov 5. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 西田知夏, 森 由紀子, 阪本卓爾, 徳永公紀,

曾我部篤史, 野崎 剛, 宇都浩文, 桶谷 眞, 坪内博仁. 鹿児島県の血液透析患者におけるC型肝炎調査報告. 第104回日本内科学会総会・講演会. 2007年4月(大阪)

- 2) 西田知夏, 屋 万栄, 森 由紀子, 徳永公紀, 竹之内聖三, 野崎 剛, 坪内博仁. 鹿児島県血液透析患者におけるC型肝炎の現況. 第52回日本透析医学会学術集会・総会. 2007年6月(大阪)

- 3) Nishida C, Uto H, Tokunaga K, Fukumoto M, Sogabe A, Nosaki T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Clinical significance of alanine aminotransferase levels and effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2009年2月(HongKong)

- 4) 4. Nishida C, Uto H, Oketani M, Tokunaga K, Nosaki T, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A, Moriuchi A, Ido A, Tsubouchi H. Clinical significance of hepatitis C virus infection and the effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients. *ANS Renal Week* 2009. 2009年10月(SanDiego)

- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

図1. HCV陽性透析患者の血小板数の変化率
-ALT値平均値別での比較-

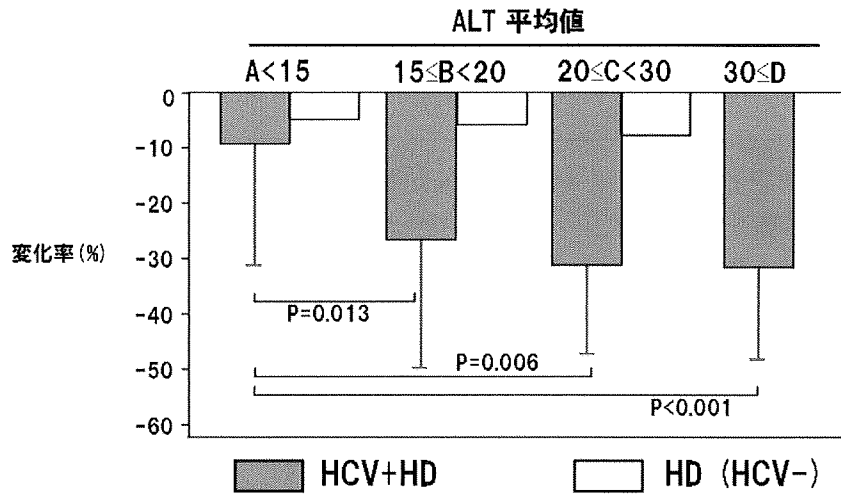
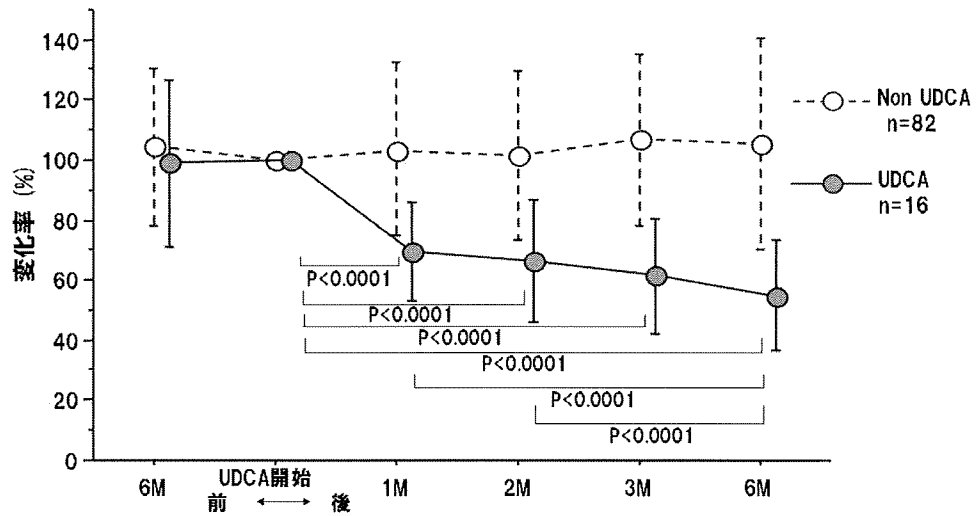


図2. HCV陽性透析患者に対するUDCA治療前後のALT値の変化



厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

研究課題 網羅的サイトカイン測定による、C型慢性肝炎の Peg-IFN/RBV
併用療法治療効果と免疫応答との関連に関する検討

研究分担者 田中榮司 信州大学医学部消化器内科 教授

研究要旨： C型慢性肝炎患者では、その病態や IFN 治療効果が宿主の免疫応答と深く関連していることが報告されており、各種サイトカイン・ケモカインがその指標として測定されている。本研究では Peg-IFN α /RBV 併用療法を施行した C型慢性肝炎患者対象に、血清サイトカイン・ケモカインを網羅的に測定し、その動態と治療効果との関連を検討した。Peg-IFN/RBV 併用療法を導入した 1 型かつ高ウイルス量の C型慢性肝炎患者 79 例を対象とし、治療開始前および治療終了後 24 週の保存血清を用いて、Luminex™ サイトカインアッセイシステムにより、19 項目の血清サイトカイン・ケモカインを測定した。多くの項目が患者群においてコントロール群と比較して有意に高値であった。治療効果との関連性について検討すると、血清 IL-12(p40)、MIP-1 β 、VEGF は SVR、IL-10 は NR と関連がある可能性が示された。サイトカイン・ケモカインの測定が C型慢性肝炎の Peg-IFN+RBV 療法の治療予測や病態の解明に有用である可能性が示唆された。

共同研究者

信州大学医学部 消化器内科 梅村武司
信州大学医学部 消化器内科 米田 傑
信州大学医学部 消化器内科 松本晶博

A. 研究目的

C型慢性肝炎患者では、その病態や IFN 治療効果が宿主の免疫応答と深く関連していることが報告されている。各種サイトカイン・ケモカインがその指標として測定されているが、いずれも限られた項目での検討であり、網羅的な測定による検討は少ない。

本研究では、Peg-IFN α /RBV 併用療法を施行した C型慢性肝炎患者を対象とし、血清サイトカイン・ケモカインを 19 項目に渡って測定し、その動態と治療効果との関連を検討した。

B. 研究方法

Peg-IFN α /RBV 併用療法を導入し、投与終了後 24 週以上経過した 1 型かつ高ウイルス量の C型慢性肝炎

患者 79 例 (SVR 31 例、TR 23 例、NR 25 例) を対象とした。また、健常人 26 例をコントロールとした。

治療開始前と治療終了後 24 週の保存血清を用いて、Luminex™ サイトカインアッセイシステムにて血清サイトカイン、ケモカイン 19 項目 (IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 (p40)、IL-12 (p70)、IL-17、IL-18、IL-23、TNF- α 、IFN- γ 、IP-10、Eotaxin、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TGF- β 、VEGF) を測定し、治療効果との関連を検討した。

C. 研究結果

測定した 19 項目のうち 6 項目 (IL-2、IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 、IFN- γ) は測定感度以下となったため、これらを除く 13 項目について検討した。

患者群(79例)とコントロール群(26例)の比較:IL-10 (P=0.035)、IL-12 (p40) (P<0.001)、IL-12 (p70) (P<0.001)、IL-18 (P=0.002)、IP-10 (P<0.001)、Eotaxin (P<0.001)、RANTES (P<0.001)が患者群で、IL-4 (P=0.013)、IL-8 (P<0.001)、VEGF (P=0.027)がコントロール群で有意に高値であった。

SVR群(31例)とnon-SVR群(48例)の治療開始前の比較:IL-12 (p40) (P=0.003)、IL-12 (p70) (P<0.001)、IL-18 (P=0.001)、MIP-1 β (P=0.002)、RANTES (P<0.001)、TGF- β (P<0.001)、VEGF (P<0.001)がSVR群で、IL-10 (P=0.003)がnon-SVR群で有意に高値であった。

VR群(54例)とNR群(25例)の治療開始前の比較:IL-12 (p40) (P<0.001)、IL-4 (P=0.001)、MIP-1 α (P=0.001)、MIP-1 β (P<0.001)、VEGF (P=0.027)がVR群で、IL-10 (P<0.001)がNR群で有意に高値であった。

SVR群とnon-SVR群の治療開始前と治療終了後24週の比較:SVR群では、IL-10 (P<0.001)、IL-12 (p40) (P=0.017)、IL-18 (P<0.001)、IL-8 (P<0.001)、IP-10 (P<0.001)、MIP-1 α (P<0.001)、MIP-1 β (P<0.001)が治療後に有意に低下した。

治療効果予測因子の検討:ROC曲線ではIL-12(p40)、MIP-1 β 、VEGFはSVRについてAUC 0.7以上であった。IL-10はNRについてAUC 0.86と非常に高値であった。

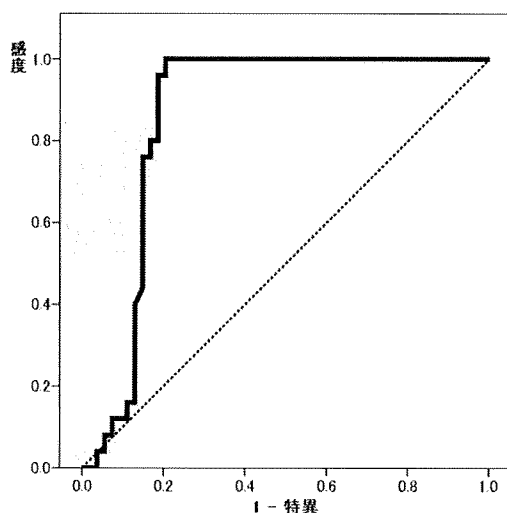


図 IL-10のNR効果予測についての検討(ROC曲線)
AUC = 0.86 P < 0.0001

治療効果と関連性のあるコア aa70の変異の有無とIL-12 (p40)、MIP-1 β 、VEGF、IL-10について検討を加えたところIL-12 (p40) (P=0.022)、MIP-1 β (P=0.057)、VEGF(P=0.049)はmutantと比較してwildの保有者で高い傾向にあり、一方、IL-10ではmutantで高値 (P=0.08)であった。

D. 考察

C型慢性肝炎患者では治療効果と関連する血清サイトカイン・ケモカインが同定された。Peg-IFN α + RBV併用療法によるウイルス排除などの病態と関連していた。特にIL-12 (p40)、MIP-1 β 、VEGFはSVRのIL-10はNR群の予測因子になる可能性が示唆された。さらにこれらはコア aa70変異との関連性も示唆されており、今後機能的意義についての検討が必要である。

E. 結論

サイトカイン・ケモカインの測定がC型慢性肝炎のPeg-IFN+RBV療法の治療予測や病態の解明に有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Matsumoto A., Tanaka E. "Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C, using viral and host factors: some concerns (reply)." *Hepatology* 2009; 49(6): 2125-2126.
2. Okanoue T., Itoh Y., Hashimoto H., Yasui K., Minami M., Takehara T., Tanaka E., Onji M., Toyota J., Chayama K., Yoshioka K., Izumi N., Akuta N., Kumada H. "Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study." *J Gastroenterol* 2009; 44(9): 952-963.

3. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M., Kurosaki M., Matsuura K., Sakamoto N., Nakagawa M., Korenaga M., Hino K., Hige S., Ito Y., Mita E., Tanaka E., Mochida S., Murawaki Y., Honda M., Sakai A., Hiasa Y., Nishiguchi S., Koike A., Sakaida I., Imamura M., Ito K., Yano K., Masaki N., Sugauchi F., Izumi N., Tokunaga K., Mizokami M. "Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C." Nat Genet 2009; 41(10): 1105-1109.

2.学会発表

1. 松本晶博、白川晴章、米田傑、上條敦、長屋匡信、城下智、小松通治、田中直樹、梅村武司、一條哲也、吉澤要、太田正穂、勝山善彦、清澤研道、田中榮司。
C型慢性肝炎 1b型高ウイルス量患者に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法の治療効果に与える

宿主およびウイルス因子の影響。第45回日本肝臓学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

今回の研究内容についてはなし。

2. 実用新案登録

今回の研究内容についてはなし。

3. その他

今回の研究内容についてはなし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

Genotype 1b 型高 HCVRNA 量例の C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法の 12 週目 HCVRNA 陰性例に対する延長治療の可否について

研究分担者 泉 並木 武蔵野赤十字病院消化器科部長

研究要旨：難治性 C 型慢性肝炎に対して、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法によって治療効果の改善が見られたが、治療中に HCVRNA が陰性化するが終了後再燃する例が存在する。再燃率を低下させることが著効率向上のために重要である。ゲノタイプ 1b 型高 HCVRNA 症例で治療を受け、12 週目までに HCVRNA が陰性化した症例で、48 週と 72 週の治療効果について検討した。12 週 HCVRNA 陰性例で 48 週間の治療で再燃するのは、60 歳以上の高齢者で、ISDR 0 箇所変異の症例であった。72 週間の延長治療によって SVR 率が改善しており、高齢者や女性では HCVRNA が 12 週で陰性化していても 72 週間の延長治療が望ましいと考えられた。

共同研究者

黒崎雅之 武蔵野赤十字病院消化器科副部長
朝比奈靖浩 武蔵野赤十字病院消化器科部長

A. 研究目的

難治例である Genotype 1b 型かつ高 HCVRNA 量の C 型慢性肝炎に対してペグインターフェロン (PEGIFN) とリバビリン (RBV) 併用によってウイルス排除 (sustained virological response; SVR) 率が向上した。しかし約 3 割の症例は治療中に HCVRNA が陰性化しても終了後に再出現する再燃例 (relapse) となる。Relapse の症例では、治療期間を延長すれば SVR となる可能性があるため至適治療期間を決めることが重要である。Genotype 1b 型かつ高 HCVRNA 量例に対しては、治療開始 12 週目に HCVRNA 量が 1/100 以下 (2 log drop) になるが、陰性化しない例に対して 72 週間の延長治療を行なうことによって SVR 率が改善することがガイドラインに盛り込まれ、医療費助成の対象になっている。しかし、12 週目の早期に HCVRNA が陰性化しても 48 週間の治療によって relapse する例がある。そこで、12 週目に HCVRNA が陰性化した症例で、relapse する症例の特徴を把握し、さらに 72 週間の延長治療を行なうことによって SVR 率が改善するか否かについて検討した。

B. 研究方法

(1) Genotype 1b 型かつ高 HCVRNA 量の C 型慢性肝炎で、PEGIFN α 2b と RBV 併用にて治療を受けた 498 例について、HCV のコア aa70, aa91 や ISDR 変異を含む治療前因子を含んだ解析を行ない、治療開始 12 週目に HCVRNA が陰性化し、48 週間の治療を行った症例で SVR になった症例と relapse した症例を比較し、再燃に関与する因子について解析した。とくに real-time PCR 法によってより正確な効果予測ができるように

なったため、real-time PCR 法によって HCVRNA 陰性化が検討されている例を中心に解析した。

(2) 治療開始 4 週、8 週、12 週の早期に HCVRNA が陰性化した症例について、48 週間で治療を終了した症例と 72 週間の延長治療を行なった症例で、SVR 率を比較検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した (新 GCP に遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

(1) PEGIFN α 2b と RBV 治療効果が判明している 292 例について、real-time PCR 法で HCVRNA が陰性化している時期別に SVR 率を解析した。治療開始 8 週間目以内の陰性化例では再燃率は 10% と低かったが、9～12 週目の HCVRNA 陰性化例では、60 歳未満の若年者では再燃は 15% であったのに対し、60 歳以上では 58% が再燃していた。この早期陰性化していたにもかかわらず再燃した症例の特徴を解析すると、女性が 67% (4/6 例) 再燃し、ISDR 変異が野生型が 57% (4/7 例) と ISDR 変異型の 11% (1/9 例) よりも再燃率が高いことが判明した。コア aa70 変異については、最年率には差が認められなかった。したがって、高齢者や女性では 12 週間目の早期に HCVRNA が陰性となっても、薬剤投与量である adherence が低いために再燃する可能性が考えられた。

(2) そこで 12 週目に HCVRNA が陰性化した症例について後ろ向きに 48 週間と 72 週間の治療成績を比較検討した。とくに 60 歳以上の女性について比較検討すると 48 週間の治療では SVR 率は 42%

と低率であったのに対し、72週間の延長治療によって71.4%(5/7例)に向上していることが確認された。72週間の延長治療によってPEGIFNとRBV両者の投与量が確保できた。

D. 考察

(1) PEGIFNとRBV併用療法によってウイルス学的な効果が改善しgenotype 1b型かつ高HCVRNA量例でもSVRが半数に得られるようになった。さらに効果を改善するためには再燃を減らすことが重要である。そこで、48週間の通常治療によって再燃する因子を解析した。48週間の治療では12週間目までの治療開始早期にHCVRNAが陰性化していても、再燃するのが多いのは、60歳以上の高齢者、女性、ISDRが0個変異の野生型であった。高齢者や女性で再燃が多いのは、12週間目以降のPEGIFNとRBVの薬剤投与が十分でない可能性があった。コアaa70変異は治療中のHCVRNA陰性化には関与するが、再燃には関連がなかった。

(2) 治療開始12週間目にHCVRNAが陰性となる症例について後ろ向きであるが48週間の通常治療と72週間の延長治療を比較検討した。再燃しやすい60歳以上の女性で比較すると、48週間の通常治療でのSVR42%に比較して、72週間の延長治療ではSVR率が71.4%に改善していた。治療期間延長によって、PEGIFNとRBVの両方の薬剤投与量が確保が達成できていたが、とくにRBVの投与量の確保が再燃を抑制することにつながったと考えられる。

E. 結論

Genotype 1b型かつ高HCVRNA量の難治性C型慢性肝炎に対して、PEGIFNとRBV併用治療を行った場合に治療開始早期にHCVRNAが陰性化するが再燃する因子を解析し、60歳以上の高齢であること、女性、ISDRが野生型であることが関与していた。これらの難治要因を含む症例に対してPEGIFNとRBV併用治療を72週間行なうことによってSVR率の改善が認められた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

(1) 板倉潤、朝比奈靖浩、玉城信治、平山慈子、田中智大、安井豊、佐藤光明、細川貴範、上田研、池田裕喜、

土谷薫、中西裕之、黒崎雅之、榎本信幸、泉並木. HCV治療早期ダイナミクスからの治療効果予測を根拠とした治療戦略 第45回日本肝臓学会総会一般演題2009.

(2) 平山慈子、朝比奈靖浩、玉城信治、佐藤光明、田中智大、安井豊、細川田貴範、池田裕喜、上田研、土谷薫、中西裕之、板倉潤、高橋有香、黒崎雅之、泉並木. C型慢性肝炎へのPEG-IFN/RBV併用療法における難治要因・再燃寄与因子とその対策. 第45回日本肝臓学会総会一般演題2009.(3) 朝比奈靖弘、黒崎雅之、泉並木. C型肝炎治療: ペグインターフェロン・リバビリン併用療法 第45回日本肝臓学会総会コンセンサスマーケティング2009.

1. 論文発表

1) Izumi N, Nishiguchi, Hino K, Suzuki F, Kumada K, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Management of Hepatitis C: Consensus of Japan Society of Hepatology 2009 Hep Res in press.

2) Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N. A Predictive Model of Response to Peginterferon Ribavirin in Chronic Hepatitis C using Classification and Regression Tree Analysis. Hep Res in press. 3) Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. Biosystems 2009 12. 4) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. Gastroenterology.

2008;134:1396-405.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

HCV Core aa70 置換から見たプロテアーゼ阻害剤 3 剤併用療法の治療効果 3 剤併用療法の治療効果

研究分担者 芥田憲夫 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院肝臓センター 医員

研究要旨：PEG-IFN/RBV/Telaprevir(TVR) 3 剤併用療法の SVR に影響する治療前のウイルス・宿主要因について検討した。初回治療/前治療再燃/前治療無効例の SVR 率は 76/83/31%。Core aa70 置換から見た SVR 率は、Arg70 が 81%に対して Gln70(His70)が 42%と統計学的有意差を認めた。更に、Core aa70 置換(Arg70)は、SVR に寄与する独立要因であることが多変量解析で確認された。Core aa91 置換・ISDR 変異数は SVR の予測因子として有用ではなかった。更に、IL28B(rs8099917)から見た SVR 率は TT 型/TG+GG 型：83/45%と TT 型の SVR は高率であったが、TG+GG 型でも約半数で SVR が得られた。更に、IL28B 遺伝子多型に Core aa70 置換を加えて SVR 率を検討すると、TG+GG 型では Arg70 が 64%であるのに対して Gln70(His70)が 30%と低率であった。将来的には IL28B 遺伝子多型と Core aa70 置換を組み合わせることでより精密な治療前効果予測が出来ると思われる。

A. 研究目的

当院では HCV-1b core aa70/91 置換[aa70 の arginine(Arg70)から glutamine(Gln70)もしくは histidine(His70)への置換と、aa91 の leucine(Leu91)から methionine(Met91)への置換]が Peginterferon/Ribavirin(PEG-IFN/RBV)併用療法難治要因であることを報告してきた。今回は新規抗ウイルス療法の中でも非常に強力な PEG-IFN/RBV/Telaprevir(TVR) 3 剤併用療法中のウイルス動態と Sustained virological response(SVR)に寄与する治療前のウイルス・宿主要因について検討した。

B. 研究方法

当院で PEG-IFN α 2b/RBV/TVR を導入された HCV genotype 1b・高ウイルス量 81 例中 24 週間 study(初期 12 週間は PEG-IFN/RBV/TVR の 3 剤併用投与し、その後の 12 週間は PEG-IFN/RBV の 2 剤併用投与)を行った 61 例を対象として、[検討 1]過去の治療歴別に見た SVR 率を検討。[検討 2]治療前ウイルス要因として Core aa70/91 置換・NS5A-ISDR 変異数から SVR 率を検討。[検討 3]Core aa70/91 置換から治療中の HCV RNA 陰性化(TaqMan HCV;検出せず)率を検討。[検討 4]SVR に寄与する独立要因を治療前の 27 因子(ウイルス・宿主・治療要因)を用いて多変量解析(Logistic regression analysis)で検討。[検討 5]PEG-IFN/RBV 治療効果予測因子として報告された宿主要因の IL28B(rs8099917)遺伝子

多型から見た SVR 率についても 51 例で検討した。

Core(aa1-191)・NS5A-ISDR(aa2209-2248)はダイレクトシーケンシング法でアミノ酸配列を決定した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報・守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新 GCP に遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

[検討 1]初回治療例の SVR 76%, 前治療再燃例の SVR 83%, 前治療無効例の SVR 31%。

[検討 2]Core aa70 置換から見た SVR 率は、Arg70 で 81%であるのに対して Gln70(His70)で 42%と統計学的有意差を持って低率であった($P=0.011$; Chi-squared test)。Core aa91 置換から見た SVR 率は、Leu91 が 71%で Met91 が 60%と統計学的に有意差無し。ISDR 変異数から見た SVR 率も、変異数 0 が 61%で変異数 1 以上が 73%と統計学的に有意差無し。

[検討 3]検討 2 で SVR に影響する結果が得られた Core aa70 置換の有無別に治療中の RNA 陰性化率を比較した。初回治療例・前

治療無効例においては持続的に Arg70 よりも Gln70(His70)で治療中の RNA 陰性化率が低率であった。初回治療例・前治療無効例では TVR が終了する 12 週経過時点から RNA が再陽性化する症例が確認された。現時点では、前治療無効かつ Gln70(His70)の症例に SVR 症例は確認されず。

[検討 4]SVR に寄与する因子は、単変量解析で Core aa70 置換(Arg70)($P=0.008$), 中性脂肪(≤ 150 mg/dl)($P=0.093$)が有意差もしくは傾向差を示し、多変量解析でも Core aa70 置換(Arg70)は独立要因として抽出された($P=0.027$)。

[検討 5]IL28B(rs8099917)から見た SVR 率は、TT 型 83%, TG+GG 型 45%と、TT 型の SVR は高率であったが TG+GG 型でも約半数で SVR が得られた。更に、IL28B 遺伝子多型に Core aa70 置換を加えて SVR 率を検討すると、TT 型では Arg70 が 86%で Gln70(His70)が 75%と何れも高率であるのに対して、TG+GG 型では Arg70 が 64%であるのに対して Gln70(His70)が 30%と低率であった。

D. 考察

HCV core 蛋白は STAT に結合しその活性化を抑制して IFN シグナル伝達経路を阻害することが報告されているが、HCV-1b core アミノ酸置換がこの様な経路を介した治療抵抗性メカニズムに関与している可能性が考えられる。PEG-IFN/RBV 併用治療効果予測因子として重要なウイルス要因の Core aa70/91 置換・ISDR 変異数の 3 剤併用療法における有用性に関する詳細な検討はこれまで行われていなかった。今回の結果から、非常に強力な 3 剤併用療法はウイルス要因の中でも Core aa91 置換・ISDR 変異数は克服可能であったが、Core aa70 置換は依然として治療効果予測因子として重要であることが分かった。更に、PEG-IFN/RBV 治療効果予測因子として報告された宿主要因の IL28B(rs8099917)遺伝子多型も 3 剤併用療法の治療効果予測因子として有用であることが分かった。将来的には IL28B 遺伝子多型と Core aa70 置換を組み合わせることでより精密な治療前効果予測が出来ると思われる。

E. 結論

HCV genotype 1b・高ウイルス量に対する PEG-IFN/RBV/TVR 併用療法(24 週間 study)における SVR は高率であった。Core aa70 置換は 3 剤併用療法における SVR に寄与するウイルス学的独立要因であることが確認された。今後は、宿主要因の IL28B も含めてウイルス・宿主・治療の多方面から更なる検討をする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Sezaki H, Yatsuji H, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Iwasaki S, Watahiki S, Kobayashi M, Miyakawa Y, Kumada H. 2009. Rapid loss of hepatitis C virus genotype 1b from serum in patients receiving a triple treatment with telaprevir (MP-424), pegylated interferon and ribavirin for 12 weeks. *Hepatology Res* 39:1056-1063.

2) Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Yatsuji H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Iwasaki S, Kumada H. 2009. Sustained virological response in a patient with chronic hepatitis C treated by monotherapy with the NS3-4A protease inhibitor telaprevir. *J Clin Virol* (in press).

3) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon and ribavirin. *J Med Virol* (in press).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

分担研究報告書

高齢者低ウイルス量 C 型肝炎に対する IFN β 治療の有用性

研究協力者 清家正隆 大分大学医学部 消化器内科 診療准教授

研究要旨：60 歳以上の高齢者で HCV-1b・高ウイルス量以外の C 型肝炎患者に対し、IFN β の有用性を検討した。I 群:IFN β 6M・8 週連日投与。II 群 IFN β 6M2 週連日投与後、週 3 回 14 週間歇投与。III 群その他の投与方法とし、非ランダム化介入試験を行った。SVR 率は 77.8%であった。いずれの投与群でも中止脱落率は少なく、投与間歇が可能であった。さらに投与後開始後 1 週間目の HCVRNA (PCR) が陰性化した症例では 8 週間投与で 94.7%の症例で SVR が得られた。効果予測として 1 週目の HCVRNA 陰性化は有用で、HCV-1b・高ウイルス量以外の C 型肝炎患者に対する respond-guided therapy として有用である

A. 研究目的

C 型肝炎患者は高齢化してきており、そのため、高血圧症や糖尿病を有している症例が多く、安全で効果的な治療法が期待される。低ウイルス量の C 型肝炎患者では、リバビリン投与の上乗せ効果は期待薄で、ガイドラインでは IFN 単独療法が推奨されている。そこで 60 歳以上で低ウイルス量の C 型肝炎患者に対する IFN β 単独療法の安全性と効果を検討した。

B. 研究方法

対象は 60 歳以上かつ低ウイルス量の HCVRNA 陽性 C 型慢性肝炎患者である。ウイルス量の基準は AMPLICOR 法で、セログループ 1 (G1) では 100KIU/ml、セログループ 2 (G2) では 200KIU/ml 未満とした。投与前の白血球数は 2500/mm³ 以上、血小板数は 7 万/mm³ 以上であることを参考に主治医が判断した。IFN β 治療研究会 17 施設において登録した 88 例のうち、2009 年 11 月まで治療を終了した 74 例を安全性評価症例とし、治療効果判定ができた 63 例を有効性評価症例とした。

方法：非ランダム化介入試験で、I 群：IFN β 6M/日を 8 週連日投与。II 群：2 週間連日投与後に 14 週間週 3 回間歇投与とした。それぞれ総投与量 336MIU を標準投与とした。安全性・有効性を考慮し量を調整した群を III 群とした。効果判定は IFN β 投与終了後 24 週時点で HCVRNA 陰性化を持続した症例を SVR とした。それ以外を NR とした。参加施設 17 施設：京都府立医科大学医学部附属病院、虎の門病院、札幌厚生病院、東京

慈恵会医科大学附属柏病院、岩井整形外科内科病院、三宿病院、都立府中病院、岐阜県総合医療センター、岐阜市民病院、広島赤十字・原爆病院、川上消化器内科クリニック、新小倉病院、大分大学医学部附属病院、大分医療センター、大分赤十字病院、長崎医療センター、南風病院

(倫理面への配慮)

既に医療保険が認められている治療法であるが、臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行った。

C. 研究結果

I 群：29 例。平均年齢 69 歳、男性 16 例、女性 13 例。G1/G2 は 8/21。II 群：18 例。男性 8 例、女性 10 例。G1/G2 は 2/16。3 群は 16 例、男性 6 例、女性 10 例。G1/G2 は 8/8。高血圧・糖尿病の合併症は各群それぞれ 62.1%、66.7%、37.5%であった。III 群で G1 が有意に多かった他背景に有意差はない。ALT、T.bil、Alb、白血球数、血小板値、ウイルス量で各群に有意差はなかった。63 例の SVR 率は 77.8%であった。I 群は 82.8%、II 群は 77.8%、III 群は 68.8%であった。各群で差はなかった (図 1)。性別、セログループ、IFN 治療歴、血小板数層別解析では SVR 率に有意な差はなかった。また、60 歳から 65 歳未満、65 歳以上 70 歳未満、70 歳以上 75 歳未満、75 歳以上での SVR 率はそれぞれ 64.3% (9/14)、71.4% (15/21)、86.4% (19/22)、100% (6/6) で高齢者においても SVR 率は低下していなかった。さらに減量率は極めて低く 9.5%