

Question

7

C型肝炎ウイルスのリアルタイム PCR 法の導入で、どのような点が有用となるのか？

Key point

- ⇒ TaqMan HCV はアンプリコア定量（ハイレンジ法/オリジナル法）の測定域を網羅することから HCV dynamics の検討に有用である。
- ⇒ TaqMan HCV はアンプリコア定性よりも感度が向上したことから、HCV RNA の陰性化時期を正確に評価できる。
- ⇒ TaqMan HCV で感度が向上することによって NVR が今まで以上に浮き彫りになる。

C型肝炎ウイルスの高感度測定系であるリアルタイム PCR 法のなかで、特に今回は COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test (TaqMan HCV) (定量域 1.2 ~ 7.8 logIU/ml) の臨床的有用性について述べる¹⁾。

まず、TaqMan HCV は従来の定量法であるアンプリコア定量 [ハイレンジ法 (定量域 3.7 ~ 6.7 logIU/ml) /オリジナル法 (定量域 2.7 ~ 5.7 logIU/ml)] と良好な相関を示し、また治療中のウイルス動態も同傾向の推移を示すことが確認されている。特にハイレンジ法/オリジナル法の定量域を網羅することから抗ウイルス療法中の HCV dynamics の検討に有用である。インターフェロン (IFN) 療法中のウイルス動態は血中ウイルスを排除する第 1 相 (first phase; 48 時間以内) と感染肝細胞を排除する第 2 相 (second phase; 48 時間~2 週間) という 2 相に分けることができる²⁾。当院における HCV genotype 1b における PegIFN/リバビリン (RBV) 併用療法 48 週間治療においても first phase で前値の 1/10 以下に HCV RNA 量が低下しない症例は治療中にウイルスが陰性化しない難治例 [non-virological responder (NVR)] になることを報告しているが、このような治療早期ウイルス動態の評価は最終的な治療効果を早期判定するうえで非常に重要となる³⁾。実際、臨床で経験するのは first phase の評価をする場面で、治療開始時の HCV RNA 量がアンプリコア定量で測定上限を超えている場合には正確なウイルス量の減衰の評価は困難である。また、second phase の評価をする場合にも、治療開始後 2 週目の HCV RNA 量がアンプリコア定量で測定感度以下になっている場合には正確なウイルス量の減衰の評価は困難である。まさに、ハイレンジ法/オリジナル法の定量域を網羅する TaqMan HCV ではこのような欠点を克服できるといえる。

さらに、TaqMan HCV ではアンプリコア定性 (感度 1.7 log/ml 以上) よりも感度が向上したことから、HCV RNA の陰性化時期をより正確に評価できる。HCV genotype 1b における PegIFN/RBV 併用療法の治療期間は 48 週間がスタンダードであるが高感度な TaqMan HCV でウ

PegIFN/RBV 48 週完遂 254 例

アンプリコア定性		TaqMan HCV
24 % (n = 61)	NVR 増加	27 % (n = 69)
21 % (n = 54)	TVR 減少	18 % (n = 46)
55 % (n = 139)	SVR 不変	55 % (n = 139)

図 1 アンプリコア定性・TaqMan HCV からみた PegIFN/RBV 治療成績全体の比較

TVR: 治療終了時 HCV RNA が陰性化した無効例
NVR: 治療終了時 HCV RNA が陰性化しない無効例

ウイルス陰性化時期を正確に評価して治療期間を工夫することが成績向上のためには重要である。具体的には 2007 年度の C 型慢性肝炎に対する治療ガイドラインで、治療開始 12 週後に HCV RNA 量が前値の 1/100 以下に低下するが HCV RNA が陽性（リアルタイム PCR）で 36 週までに陰性化した症例ではプラス 24 週間（トータル 72 週間）の投与期間延長することで sustained virological response (SVR) 率が改善することを示している⁴⁾。また、TaqMan HCV で感度が向上することによって従来はアンプリコア定性で陰性を示していた検体が実は陽性であることが確認され、NVR が今まで以上に浮き彫りになってくるものと思われる（図 1）。このような難治例の NVR を正確に絞り込めることは cost/benefit や risk/benefit の観点から肝発癌予防を目的とした IFN 単独療法など⁵⁾のその他の抗 HCV 療法への早期移行を可能にすることから有用である。

C 型肝炎治療の最終目標は肝硬変・肝癌への移行を減らし生命予後を改善することであり、効果的かつ安全に肝炎を沈静化させる抗 HCV 療法を個々の症例別に柔軟に選択していく必要がある。そのためにもリアルタイム PCR で治療中のウイルス動態を正確に評価することは重要になるものと思われる。

文献

- 1) Sizmann D, Boeck C, Boelter J, et al. Fully automated quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in human plasma and human serum by the COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® System. J Clin Virol. 2007; 38: 326-33.
- 2) Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. Science. 1998; 282: 103-7.
- 3) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Prediction of response to pegylated interferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphisms in the viral core protein and very early dynamics of viremia. Intervirology. 2007; 50: 361-8.
- 4) 熊田博光. B 型及び C 型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床研究. 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). 平成 19 年度総括・分担研究報告書. 2008. p.7-11.
- 5) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Efficacy of low-dose intermittent interferon-alpha monotherapy in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b who were predicted or failed to respond to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy. J Med Virol. 2008; 80: 1363-9.

〈芥田憲夫 熊田博光〉

治療薬 ハンドブック

Handbook of
CLINICAL
DRUG

薬剤選択と処方のポイント

2009

監修 高久 史磨

編集 堀 正二 / 菅野 健太郎 / 門脇 孝
乾 賢一 / 林 昌洋

JiHO じほう

治療薬ハンドブック2009

薬剤選択と処方のポイント

定価 本体4,200円(税別)

平成20年1月25日 2008年版発行
平成20年4月15日 2008年版第2刷発行
平成21年1月30日 2009年版発行

監修 たかく 高久 ふみまる 史麿
編集 ほり 堀 まさつぐ 正二・すかのけんたろう 菅野健太郎・かどわき 門脇 たかし 孝
いぬい 乾 けんいち 賢一・はやし 林 まさひろ 昌洋

発行人 武田 正一郎

発行所 株式会社 じほう

101-8421 東京都千代田区一ツ橋2-6-3(一ツ橋ビル)

電話 編集 03-3265-7755 販売 03-3265-7751

振替 00190-0-900481

〈大阪支局〉

541-0044 大阪市中央区伏見町2-1-1(三井住友銀行高麗橋ビル)

電話 06-6231-7061

©2009 組版 (株)ピーコム・凸版印刷(株)／印刷 凸版印刷(株)／製本 (株)星共社
Printed in Japan

本書の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は株式会社じほうが保有します。

万一落丁、乱丁等の場合は、お取替えいたします。

ISBN978-4-8407-3909-2

・JCLS<(株)日本著作出版権管理システム委託出版物>

本書の無断複製は著作権法上での例外を除き禁じられています。

複製される場合は、そのつど事前に(株)日本著作出版権管理システム

(電話03-3817-5670, FAX 03-3815-8199)の許諾を得てください。

治療薬使用のポイント

- B型肝炎：若年のHBe抗原陽性例はインターフェロン(IFN)長期間歇，HBe抗原陰性例は経過観察が原則
- B型肝炎：中高年症例の核酸アナログ未使用例はエンテカビル(ETV)が第一選択
- B型肝炎：ラミブジン(LAM)投与中の耐性ウイルス出現に伴う肝炎悪化はアデホビル(ADV)併用で対処
- C型肝炎：初回治療の高ウイルス量症例，再投与例ではPEG-IFN/リバビリン(RBV)併用療法が基本
- C型肝炎：高ウイルス量症例，再投与症例のRBV非適応例ではIFN単独長期投与が必要

基本知識

肝疾患のなかで治療を要する代表的なものとしてはB型肝炎ウイルス(HBV)・C型肝炎ウイルス(HCV)に起因する肝疾患が挙げられる。本稿では肝疾患のなかでも特にB型・C型肝炎の病態・治療について解説する。

B型・C型肝炎は慢性肝炎，肝硬変および肝癌へと進行する疾患であり，慢性肝炎から発癌する場合もある。いずれも肝炎の活動性の高い状態が持続する症例ではより早期に病期の進展が認められる。よって最終的な治療目標はウイルス排除に伴う肝組織進展抑制と肝発癌抑制である。ただし，わが国のB型肝炎は母子感染症例が主体であり，ウイルス学的治癒といえるHBs抗原陰性化状態まで持ち込むことはかなり困難である。また，C型肝炎に関しても同様にインターフェロン(IFN)治療抵抗性の症例がわが国では大半を占めているため，HCV RNA陰性化のウイルス学的治癒状態まで持ち込むことが困難な状況である。このようにウイルス学的治癒を望めないような症例では少なくとも肝炎鎮静化によって組織進展予防・発癌予防を行う必要がある。

B型慢性肝炎でHBe抗原陽性の状態はHBV DNA量が多く，ALT値も高く，病期の進展が速い。また，HBe抗原が陰性化してHBe抗体が陽性化(sero-conversion)すればHBV DNA量の低下に伴いALT値が低下する場合も多い

が、ALT値の上昇が頻回に起きてくる症例ではやはり肝硬変まで進展する。よって、B型慢性肝炎の第1の治療目標はHBe抗原陰性化に伴う肝炎沈静化であり、第2の目標はHBV DNA量やALT値の低値安定化である。ただし、HBVキャリアの多くは25歳までに自然経過中に肝炎を起こしながら seroconversion し肝炎は沈静化するため、自然経過で seroconversion する可能性が低く、ALT異常値を繰り返すような進行する可能性が高い症例が治療対象となる。

C型慢性肝炎治療も同様で、ALT値の上昇が頻回に起きてくる症例では肝硬変・肝癌まで早期に進展する。よって、第1の治療目標はHCV RNAを陰性化させて肝炎を沈静化させることであり、第2の目標はHCV RNA量やALT値を持続的に低値安定化させることとなる。

治療薬の分類

C型肝炎治療はIFN単独療法・IFN/リバビリン(IFN/RBV)併用療法といった抗ウイルス効果・抗炎症効果の両者を期待したIFN関連療法が主体である。また、ALT持続低値を目指したIFN以外の治療としてはグリチルリチン製剤、ウルソデオキシコール酸や瀉血療法などが挙げられる。これらは抗ウイルス効果は期待できないものの抗炎症療法(肝庇護療法)として有用である。

B型肝炎治療は核酸アナログ療法[ラミブジン(LAM)、アデホビル(ADV)、エンテカビル(ETV)]・IFN療法といったHBe抗原陰性化・HBV DNA量低下・ALT低値安定化といった抗ウイルス効果・抗炎症効果の両者を期待した治療が主体である。

治療薬の使用にあたって

2008年3月に厚生労働省治療標準化に関する臨床研究班から発表されたウイルス排除を目的としたC型慢性肝炎の治療ガイドラインとB型慢性肝炎の治療ガイドラインを示す(表1、表2、表3)¹⁾。

(1) C型慢性肝炎の治療ガイドライン

- ・初回投与の高ウイルス量症例、再投与症例ではIFN/RBV併用療法が治療の基本である
- ・高ウイルス量症例、再投与症例でRBV非適応例ではIFN長期投与が必要である
- ・IFN治療中にHCV RNAの陰性化が得られない症例では、肝機能正常化した場合は発癌予防を目指した治療も検討する
- ・RBVには催奇形性の問題があり、妊娠の可能性のある女性には禁忌で、妊娠する可能性のあるパートナーがいる男性患者へ投与する場合も避妊が必要である

表1 C型慢性肝炎に対する初回治療ガイドライン

	Genotype 1	Genotype 2
高ウイルス量 1Meq/mL 5.0Log IU/mL 300fmol/L 以上	ペグインターフェロンアルファ-2b +リバビリン(レベトール) (48週間) ペグインターフェロンアルファ-2a +リバビリン(コペガス) (48週間)	ペグインターフェロンアルファ-2b +リバビリン(レベトール) (24週間)
低ウイルス量 1Meq/mL 5.0Log IU/mL 300fmol/L 未満	インターフェロン(24週間) ペグインターフェロンアルファ-2a (24~48週間)	インターフェロン(8~24週間) ペグインターフェロンアルファ-2a (24~48週間)

熊田博光：肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究. 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)平成19年度総括・分担研究報告書. 7-10, 2008

表2 35歳未満B型慢性肝炎の治療ガイドライン

治療対象はALT ≥ 30IU/Lで：HBe抗原陽性はHBV DNA量5 log copies/mL以上
HBe抗原陰性は4 log copies/mL以上

HBV DNA量	≥ 7 log copies/mL	< 7 log copies/mL
e抗原陽性	①インターフェロン長期投与 (3カ月以上) ②エンテカビル	インターフェロン長期投与 (3カ月以上)
e抗原陰性	①経過観察 ②インターフェロン長期投与(3カ 月以上)あるいはエンテカビル	経過観察 (F2以上の進行例にはインターフ ェロン, エンテカビル)

熊田博光：肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究. 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)平成19年度総括・分担研究報告書. 7-10, 2008

表3 35歳以上B型慢性肝炎の治療ガイドライン

治療対象はALT ≥ 30IU/Lで：HBe抗原陽性はHBV DNA量5 log copies/mL以上
HBe抗原陰性は4 log copies/mL以上

HBV DNA量	≥ 7 log copies/mL	< 7 log copies/mL
e抗原陽性	①エンテカビル ②エンテカビル+インターフェロ ン連続療法(3カ月以上)	①エンテカビル ②インターフェロン長期投与 (3カ月以上)
e抗原陰性	エンテカビル	エンテカビル

熊田博光：肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究. 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)平成19年度総括・分担研究報告書. 7-10, 2008

(C) B型慢性肝炎の治療ガイドライン

- 抗ウイルス療法は、ALT \geq 30IU/Lの場合に考慮する。しかし高齢者やHBe抗原陰性例、抗ウイルス薬の投与が難しい例では肝庇護療法で経過をみることも可能である
- 若年(35歳未満)症例では、抗ウイルス療法のIFN長期間歇、またはステロイド、IFN、核酸アナログの短期併用投与が原則。ただし、組織像の軽い症例では自然経過でのHBe抗原のseroconversionを期待しフォローアップすることもある
- 抗ウイルス療法の中高年(35歳以上)症例の核酸アナログ未使用例ではETVが第一選択になる
- LAM耐性ウイルスによる肝炎に対しては、ADVが第一選択になる。組織学的進行例ではHBV DNA量が上昇した時点でADVを開始する
- 若年でも母子感染例はIFN抵抗性のことが多く、ETVの投与を考慮する

適応外の使用

- C型肝炎難治例に対するPEG-IFN/RBV併用中のHCV RNA陰性化時期が遅い症例では72週間までの延長投与によって治療成績の改善を期待できる
- C型肝炎難治例においてはプロテアーゼ阻害薬を含む多剤併用療法が将来期待される
- B型肝炎に対するPEG-IFN療法は耐性ウイルスの問題がないことから将来期待される
- B型肝炎由来の肝癌根治療法後の再発予防を目的とした核酸アナログ療法が期待される

服薬指導

- B型肝炎の核酸アナログ製剤は毎日欠かさず内服してください。自己判断による内服中断は肝炎悪化の危険性があり注意が必要です
- B型肝炎の核酸アナログ製剤は長期内服に伴う耐性ウイルスの出現から肝炎が悪化する可能性があります。定期採血が必要です
- C型肝炎のPEG-IFN/RBV併用療法は血球系検査を適切に行い減量・休薬のタイミングを見逃さないためにも定期採血が必要です
- C型肝炎のRBV併用療法は催奇形性の問題から治療期間中、治療終了後6ヵ月間は避妊が必要です

Topics

- HCV core領域の70番・91番目のアミノ酸置換はPEG-IFN/RBV併用

治療効果に影響する。さらにこれらのアミノ酸置換が肝発癌率に影響していることも報告されている²⁾

- ・核酸アナログ製剤のLAMとETVではHBV DNA量低下・HBe抗原陰性化・ALT正常化のいずれにおいてもETVが優れている。さらに、ETVはLAMと比較して耐性ウイルスの出現率が低いことも報告されている³⁾

◆文献

- 1) 熊田博光：肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究。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)平成19年度総括・分担研究報告書, 7-10, 2008
- 2) Akuta N, et al : Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 46 : 1357-1364, 2007
- 3) Colonna RJ, et al : Entecavir resistance is rare in nucleoside naïve patients with hepatitis B. *Hepatology* 44 : 1656-1665, 2006

(芥田 憲夫・熊田 博光)

28

肝疾患治療薬

肝・骨格筋・脂肪組織における 脂質代謝からみた NAFLD/NASH の 治療戦略を探る

清家正隆*

KEY WORDS

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD), 分岐鎖アミノ酸 (BCAA), インスリン抵抗性, 脂肪酸, 抗肥満作用

SUMMARY

BCAA は肝硬変症において、肝性脳症を改善し、血清アルブミン値を保ち、予後を改善することが知られている。最近では BCAA によるインスリン抵抗性改善効果や BMI が 25 kg/m² 以上の肥満を合併した肝細胞癌では、BCAA 内服群で癌の再発抑止効果が得られることが報告されている。さらに、ロイシンの mTOR を介した蛋白合成、糖代謝改善、イソロイシンの VEGF 抑制効果など多彩な生理活性作用を有する。BCAA は PPAR α -UCPs の脂肪酸酸化により肝・骨格筋・脂肪組織での脂質代謝改善作用を有することが示唆された。NAFLD の治療は肝臓における脂肪酸の肝臓への供給を防ぎ、脂肪酸の酸化を促進し、さらに NASH では酸化ストレスを減じる治療戦略が基本である。BCAA は食事療法として的高蛋白食・低炭水化物食における蛋白補給、運動療法時の筋における蛋白の回復、薬物療法としての肝・骨格筋・脂肪組織での脂質代謝改善効果を有し、NAFLD における治療の新たな選択肢としての可能性がある。

はじめに

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) は、食餌中の中性脂肪 (トリグリセライド: TG) や末梢脂肪組織由来の脂肪酸の肝臓への供給と酸化のバランスの不均衡により生じる。インスリン抵抗性発症にも関与し、酸化ストレスが加わることでより非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) の病態にいたると考えられている¹⁾。この経過は、いわゆる “two hit theory¹⁾” として知られており、first hit として脂肪肝があり、second hit として酸化ストレス、エンドトキシン、インスリン抵抗性などが加わって NASH が発症するとされている。発症の要因は複雑でありさまざまな治療戦略が考えられている。

治療の介入の第一歩は、脂肪酸の肝臓への流入をまず防ぐことである。実際、外科的な介入 (laparoscopic adjustable gastric banding) をおこない、食事量を減らすことにより体重の減量が得られ、NAFLD の肝組織所見の改善が得られたとの報告²⁾や栄養指導の短期的な介入も有効であったとの報告³⁾がみられ、体重の制御が

* SEIKE Masataka/大分大学医学部附属病院肝疾患相談センター

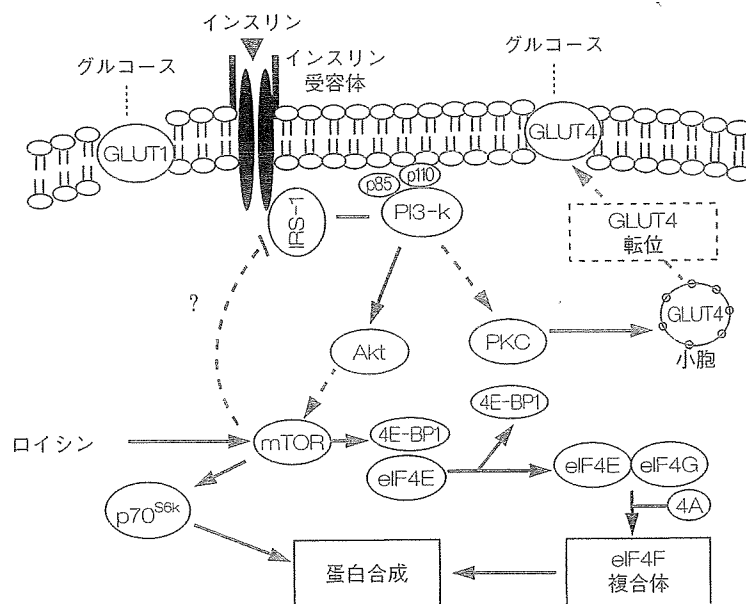


図10 ロイシンの作用部位
(Layman DK et al, 2004¹⁰⁾より引用)

NAFLD の治療の中心であることが確認されている。当科では行動療法としてのグラフ化体重日記を中心に治療をおこなっている⁴⁾。しかし、体重の減量過程で挫折する患者も数多く、適切な減量については課題が残されている。減量の実行と継続の困難さに加え、減量に伴う代謝の変化がその一因とも考えられている⁵⁾⁶⁾。減量を長期に維持するための戦略が必要である。

BCAA の生理活性

分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acid : BCAA) の生理活性が注目されている。ロイシン、イソロイシン、バリンの BCAA は、肝硬変症における肝性脳症の改善や低アルブミン血症時のアルブミンの回復などの目的にすでに用いられている。最近では発癌を抑止するとの報告もみられる⁷⁾⁸⁾。

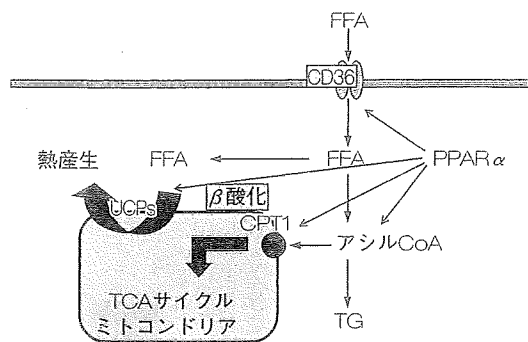
ロイシンは蛋白の基質としてのみならず、mammalian target of rapamycin (mTOR) を介して蛋白合成を促し、空腹時や飢餓時の筋肉の消耗を防ぐことが明らかになっている。筋肉ではインスリン/PI3 キナーゼシグナリングの modulators, プロテインキナーゼ C(PKC) を介して糖の利用を調整することも明らかになった (図10)⁹⁾。

また、イソロイシンはロイシンと同様な生理作用とともに、mTOR を介して血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) を抑制し、転移性肝癌の増殖を抑制する作用も報告された¹⁰⁾。バリンの生理活性は不明であったが、最近、肝硬変症で機能低下した樹状細胞の機能を回復させることが報告された¹¹⁾。

BCAA の生理活性はきわめて多様で、肝・脂肪組織における作用も報告されるようになった。BCAA の肝・骨格筋・脂肪組織での脂質代謝について最近の知見を述べる。

脂肪酸の代謝

NAFLD はメタボリックシンドロームの表現型である。病態として、栄養過剰、運動不足に伴う、内臓脂肪蓄積が背景にある。高脂肪食を用いたラットでは、栄養摂取に伴い、肝臓に脂肪が蓄積し、肝臓への脂肪蓄積から遅れて、血中のコレステロールや TG が上昇、インスリン抵抗性を惹起するとされている¹²⁾。肝臓の脂肪蓄積がインスリン抵抗性発症にきわめて重要である。肝・骨格筋の余分な脂肪蓄積は臓器でのインスリン感受性の低下を伴い、高インスリン血症をもたらす。高インスリン血症は肝臓における insulin receptor substrate-2 (IRS-2)



図② 細胞内の脂肪酸代謝

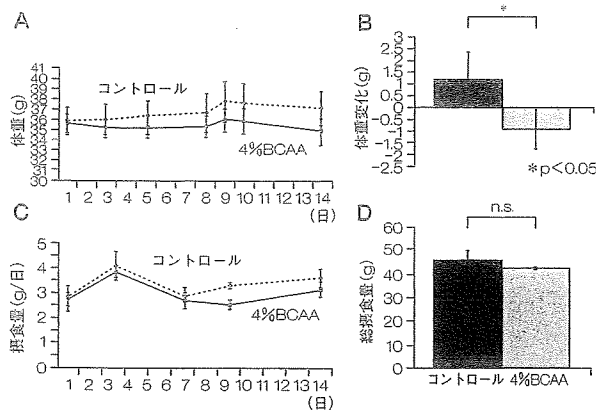
の発現・リン酸化の低下を招き、肝臓のインスリン抵抗性を悪化させる。また、肝・脂肪組織では脂肪合成の核内転写因子である sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c) の発現・活性化を促進することで脂肪蓄積を促す。

血中や脂肪組織の TG は、加水分解を受け、遊離脂肪酸 (free fatty acid : FFA) となり、肝細胞に取り込まれる。また、糖質から FFA が供給される経路もある。脂肪酸はアシル CoA へと変換され、ミトコンドリア内で β 酸化を受けアセチル CoA へと変換される。アシル CoA は一部 TG となり、リン脂質やアポリipoprotein B (apoB) の修飾を受け VLDL となり血中へと分泌される (図②)。

CD36/FAT は脂肪酸や VLDL の取り込みに関係する膜の糖蛋白で、肝臓では peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α, 脂肪組織では PPARγ に制御されている¹³⁾。Carnitin palmitoyltransferase 1 (CPT1) はミトコンドリアの β 酸化の key 酵素で PPARα に制御されている。

BCAA の肝・骨格筋・脂肪組織における脂質代謝への影響

ロイシンが食事誘導性の肥満糖尿病モデルマウスで、脂肪量を減らすのみならず、安静時のエネルギー消費を減少させ、さらに糖代謝やコレステロール代謝も改善することが報告された¹⁴⁾。骨格筋・脂肪組織での uncoupling protein (UCP) 3 の発現を亢進させ、エネルギー消



図③ 体重の推移と摂食量

- A) 体重の推移
 - B) 体重変化 (2 週間の増減)
 - C, D) 摂食量
- 摂食量は両群で変化ないが、BCAA 投与群で体重の減少を認めた。

費を促進する¹⁴⁾。われわれもこの点に注目し同様の実験をおこなった。8 週齢の C57BL/6J を用い、45% high fat diet (HFD) を 4 週間摂食させたのち、4% BCAA を加え、2 週間自由に摂食させた。BCAA 添加群と非添加群において以下の項目で比較検討した。評価項目としては投与終了後の血清グルコース (blood sugar : BS), インスリン値 (immunoreactive insulin : IRI), TG, FFA, 脂肪酸代謝の取り込みの指標としての CD36/FAT, ミトコンドリアにおける β 酸化の評価として、CPT1 および脱共役蛋白である UCPs, 脂肪酸代謝をつかさどる PPARα をウエスタンブロット法で評価した。その結果、両群で摂食量に有意差はなかった。体重は BCAA 投与群で有意に低下していた (図③)。肝・骨格筋・脂肪組織で脂肪の減少が誘導された (図④)。肝組織中の脂肪は、病理組織学的な検討で肝細胞内の脂肪滴は明らかに改善し、組織含有 TG 量も BCAA 投与群で明らかに減少していた。血清 BS, TG, FFA は両群に有意な差はなかった。しかし、血清 IRI は BCAA 投与群で有意に減少していた。メタボリックシンドロームに関連するアディポネクチン¹⁵⁾、レプチンは両群で有意な差はなかった。

肝臓では CD36/FAT の発現が減少していた。CPT1 に両群で有意な差はなかった。PPARα, UCP2 は有意に発現が増加していた (図⑤)。骨格筋では BCAA 投与群

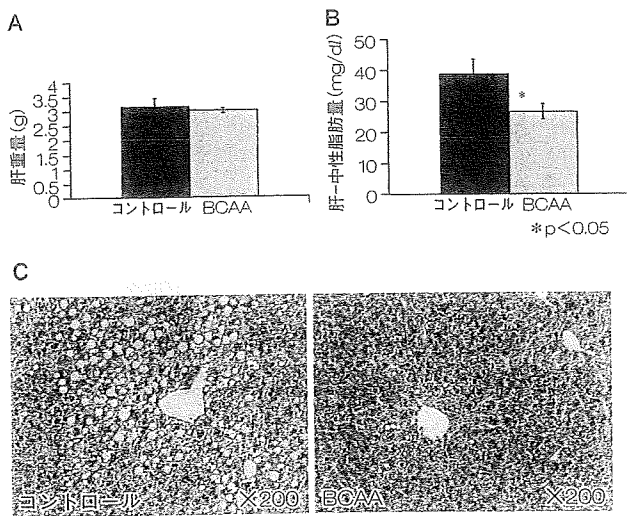


図4 BCAAによる肝脂肪化改善効果

- A) 肝重量
- B) 中性脂肪量
- C) 肝組織像 (HE染色)

BCAA群では肝臓の中性脂肪蓄積が抑制された。

で、組織中のTG量は減少していた。また、CD36/FATはBCAA投与群で発現が増強しており、PPAR α 、UCP3の発現も同様に増加していた。白色脂肪組織においてもTG量はBCAA投与群で減少していた。CD36/FATやUCP2では有意な差はなかったがPPAR α はBCAA群で発現が増加していた。まとめると、BCAAは骨格筋や脂肪組織ではCD36/FATを介し脂肪酸の細胞内への取り込みを亢進させ、UCPを介した脂肪酸の燃焼をおこなうことが明らかにされた(図5)。肝臓では脂肪酸の燃焼がPPAR α -UCP2を介して亢進しており、各臓器における脂肪酸の動態は、NAFLDの戦略を考えるうえで有用である。

さらにBCAAのなかではイソロイシンに最も強い作用が確認された。

おわりに

NAFLDの治療戦略はこれまで、肝臓への脂肪酸の供給と β 酸化のバランスで考えられていた。NASHではさらに酸化ストレスの抑止としてさまざまな薬剤が検討されてきた。とくにBCAAの多彩な生理活性を追及す

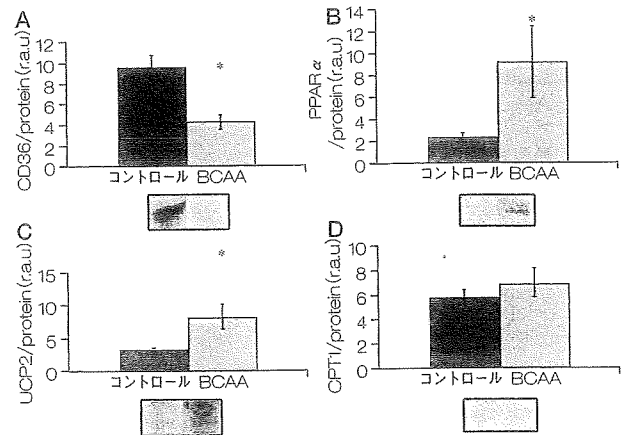


図5 肝臓における脂質代謝マーカー
r.a.u: relative arbitrary unit

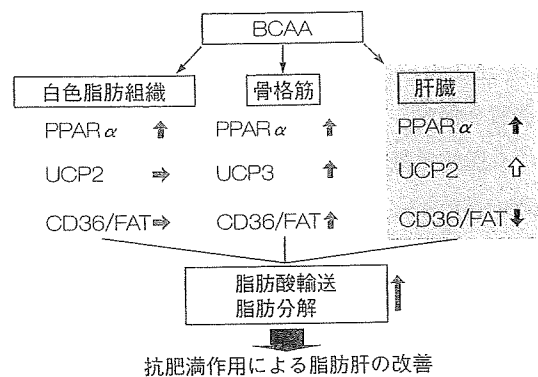


図6 BCAAの各臓器における脂肪酸代謝改善作用の機序

ることにより、肝・骨格筋・脂肪組織など統合した治療戦略へのきっかけになりうる。肝臓での変化のみならず、他臓器での代謝の変化もあわせ、治療戦略を練る必要がある。とくに、BCAAは食事療法における、高蛋白食・低炭水化物食による減量¹⁶⁾や運動療法時の筋肉の回復に有用である。さらに本稿で述べた糖質・脂質代謝の薬理作用などからエネルギー効率の向上、熱産生を促し、蛋白の消失を防ぎ、糖代謝を改善するため、飽食の時代に適していると考えられる。最近のメタボリックシンドロームに対する、治療戦略すべてに、関連する特異な治療薬・サプリメントとして存在することとなる。実際の診療での減量の継続は困難であることも多く、食事療法、運動療法、薬物療法を支援する位置づけとしても考えてみたい。



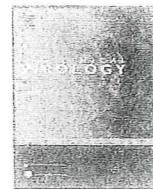
文 献

- 1) Day CP, James OF : Steatohepatitis : a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114** : 842-845, 1998
- 2) Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR *et al* : Nonalcoholic fatty liver disease : Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology* **39** : 1647-1654, 2004
- 3) Huang MA, Greenon JK, Chao C *et al* : One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis : a pilot study. *Am J Gastroenterol* **100** : 1072-1081, 2005
- 4) Fujimoto K, Sakata T, Etou H *et al* : Charting of daily weight pattern reinforces maintenance of weight reduction in moderately obese patients. *Am J Med Sci* **303** : 145-150, 1992
- 5) Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J : Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med* **332** : 621-628, 1995
- 6) Rosenbaum M, Goldsmith R, Bloomfield D *et al* : Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J Clin Invest* **115** : 3579-3586, 2005
- 7) Muto Y, Sato S, Watanabe A *et al* : Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* **35** : 204-214, 2006
- 8) Kobayashi M, Ikeda K, Arase Y *et al* : Inhibitory effect of branched-chain amino acid granules on progression of compensated liver cirrhosis due to hepatitis C virus. *J Gastroenterol* **43** : 63-70, 2008
- 9) Nishitani S, Takehana K, Fujitani S *et al* : Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288** : G1292-G1300, 2005
- 10) Murata K, Moriyama M : Isoleucine, an essential amino acid, prevents liver metastases of colon cancer by antiangiogenesis. *Cancer Res* **67** : 3263-3268, 2007
- 11) Kakazu M, Kanno N, Ueno Y *et al* : Extracellular branched-chain amino acids, especially valine, regulate maturation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **179** : 7137-7146, 2007
- 12) Fukuchi S, Hamaguchi K, Seike M *et al* : Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **229** : 486-493, 2004
- 13) Endo M, Masaki T, Seike M *et al* : TNF- α induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med (Maywood)* **232** : 614-621, 2007
- 14) Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE *et al* : Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* **56** : 1647-1654, 2007
- 15) Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H *et al* : Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- α in KK-Ay obese mice. *Hepatology* **40** : 177-184, 2004
- 16) Layman DK, Baum JJ : Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr* **134** : 968S-973S, 2004

せいけ・まさたか

 清家正隆 大分大学医学部附属病院肝疾患相談センター

 大分県生まれ。
 専門は肝臓病・肝癌治療。
 研究テーマは脂肪性肝炎の病態解明。



Case report

Sustained virological response in a patient with chronic hepatitis C treated by monotherapy with the NS3-4A protease inhibitor telaprevir

Fumitaka Suzuki^{a,*}, Yoshiyuki Suzuki^a, Norio Akuta^a, Hitomi Sezaki^a, Hiromi Yatsuji^a, Yasuji Arase^a, Miharuru Hirakawa^a, Yusuke Kawamura^a, Tetsuya Hosaka^a, Masahiro Kobayashi^a, Satoshi Saito^a, Kenji Ikeda^a, Mariko Kobayashi^b, Sachiyo Watahiki^b, Rie Mineta^b, Satomi Iwasaki^b, Hiromitsu Kumada^a

^a Department of Hepatology, Toranomon Hospital, 2-2-2 Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105-8470, Japan

^b Research Institute for Hepatology, Toranomon Branch Hospital, Kawasaki, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2009

Received in revised form 10 July 2009

Accepted 25 September 2009

Keywords:

Hepatitis C virus

Direct-acting antiviral

Telaprevir

Sustained virological response

ABSTRACT

Here, we describe for the first time a case of sustained virological response (SVR) achieved in a patient with chronic hepatitis C (CH-C) by monotherapy with a NS3-4A protease inhibitor, telaprevir, without interferon therapy. A 59-year-old treatment-naïve Japanese man was enrolled in a phase II trial of telaprevir by repeat oral administration at a dose of 750 mg every 8 h for 24 weeks. At the start of treatment, he exhibited a low-level viremia with genotype 1b of the hepatitis C virus (HCV). After the first week of treatment with telaprevir, serum HCV RNA was undetectable, and negativity remained until the end of treatment. Moreover, he was evaluated as having a SVR after the post-treatment 24-week follow-up program. Two characteristics may explain the strong antiviral activity of telaprevir in the present case. First, although pre-treatment PCR-direct sequencing and cloning for the N-terminal in the NS3 region showed 2/101 (2%) amino-acid variant (R157A) in 1 of 52 independent clones, the R157A substitution has only a low-level resistance to protease inhibitors and his viral load was low. Second, when compared to a consequence sequence of 35 treatment-naïve patients with HCV genotype 1b, R130K and Q195K substitutions were unique to the present case. Although it is presently unknown whether the R130K and Q195K substitutions are related to SVR, this case suggests that long-term telaprevir monotherapy may be effective in CH-C patients with genotype 1 and a low viral load.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The goals of current standard therapy in patients with chronic hepatitis C (CH-C) are long-lasting eradication of the virus and a decrease in disease-related hepatic mortality. Standard treatment uses a combination of pegylated interferon and ribavirin (PEG-IFN-RBV), which provides a sustained virological response (SVR) rate of over 50%.^{1,2} In Japan, approximately 70% of patients with CH-C are infected with genotype 1b, and those with a high titer of genotype 1b (≥ 100 IU/mL [Amplifloor; Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan]) have lower rates of SVR (<50%), even on 48 weeks of PEG-IFN-RBV combination therapy.³ Further, although treatment for CH-C is currently based on interferon (IFN), use of this agent is associated with serious adverse effects in some patients, such as mental disorders, apathy, and laboratory abnormalities.^{1,2,4} Moreover, most CH-C patients in Japan over 70 years of age cannot receive IFN ther-

apy due to either or both co-morbidities and the risk of adverse effects. For these reasons, a new treatment strategy is needed for patients with CH-C that displays high SVR rates and a favorable side-effect profile.

One recently introduced treatment strategy for CH-C is inhibition of the NS3-4A protease in the HCV polyprotein. Potential inhibitors include telaprevir (VX-950; MP-424; Mitsubishi Tanabe Pharma Co., Osaka, Japan), which has been selected as a clinical therapy candidate for the treatment of CH-C.⁵ In some patients with genotype 1 and a high viral load, however, the efficacy of telaprevir monotherapy was limited, and combination therapy of telaprevir plus PEG-IFN-RBV is now standard.^{6–10} On this background, we therefore report here for the first time a patient with CH-C who achieved a SVR following monotherapy with telaprevir.

2. Case report

A 59-year-old Japanese man was admitted to Toranomon Hospital, Tokyo in July 2007 following a positive result for HCV RNA at general check-up. Laboratory tests before treatment showed mild

* Corresponding author. Tel.: +81 44 877 9111, fax: +81 44 360 1623.
E-mail address: fumitakas@toranomon.gr.jp (F. Suzuki).

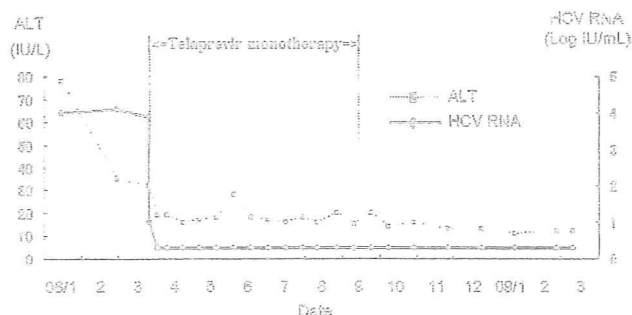


Fig. 1. Clinical course during and after 24 weeks of telaprevir monotherapy.

elevation of ALT (46 IU/L), and persistent HCV infection with genotype 1b and low-level viremia (4.5 Log IU/mL [COBAS TaqMan HCV test, Roche Diagnostics K.K. Tokyo]) that continued to remain low until the start of treatment. He was diagnosed with CH-C by peritoneoscopy and liver biopsy (mild hepatitis [A1] and moderate fibrosis [F2]) at our hospital in February 2008. He had not received IFN therapy or any other antiviral drugs, and was enrolled in a phase II trial of telaprevir. Written informed consent was obtained, and the study was conducted in compliance with Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki. Treatment with telaprevir was started in March 2008, at which time serum HCV RNA was 3.9 Log IU/mL. Treatment was by repeat oral administration at a dose of 750 mg every 8 h for 24 weeks. Serum HCV RNA was undetectable after the first week and remained negative until the end of treatment (September 2008), and moreover remains undetectable as of March 2009. He was evaluated as having a SVR after the post-treatment 24-week follow up program (Fig. 1).

The genetic sequences of the 308 nucleotides (203 amino acids) in the NS3 region of HCV isolates from the patient were compared before treatment with telaprevir. HCV RNA was extracted from 100 µL of serum and the

nucleotide sequences were determined by direct sequencing and cloning. The primers used to amplify the NS3 region were NS3-F1 (5'-ACAACCCCGCCCTCTGCGGCACAT-3'; nucleotides 3295–3316) and NS3-AS2 (5'-GCTCTTGGCCGCTGCCAGTGGGA-3'; nucleotides 4040–4019) as the first (outer) primer pair and NS3-F3 (5'-CAGGGG1GGCGG1CCCT1-3'; nucleotides 3390–3407) and NS3-AS2 as the second (inner) primer pair.¹¹ Thirty-five cycles of first and second amplifications were performed as follows: denaturation for 30 s at 95 °C, annealing of primers for 1 min at 63 °C, extension for 1 min at 72 °C, and final extension was performed at 72 °C for 7 min. PCR-amplified DNA was purified after agarose gel electrophoresis and amplification products of the second round PCR were ligated with plasmid and transformed in *Escherichia coli* in a cloning kit (TA Cloning; invitrogen, Carlsbad, CA). Dideoxynucleotide termination sequencing was performed with the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Japan, Tokyo). Sequences of 32 independent clones from the sample were determined and analyzed. The pre-treatment analyses by PCR-cloning showed a variant (T54A) resistant to protease inhibitors in 1 of the 32 clones.

We also made a consensus sequence of the NS3 region from the PCR-direct sequences of 35 treatment-naïve Japanese patients with HCV genotype 1b in our hospital (Fig. 2). Compared to the consensus sequence, there were a total of 5 identical substitution variants (V48I, P89S, S122G, R130K, Q195K) within the 32 independent clones from this patient, among which R130K and Q195K were unique to this patient.

3. Discussion

Previous studies showed that telaprevir monotherapy for HCV patients with genotype 1b and high levels of viremia had substantial antiviral activity, and the median maximum change was 2.72 Log IU/mL with a median time to 750 mg every 8 h for 2 weeks.^{6,7} In Keesink et al., HCV RNA decreased below the limit of

	1	10	20	30	40	50	
CONSENSUS	AFITATYSQCT	RGLLGCIITS	LTGRDRIKQVE	SRVQVVEAT	QEPLATVNG		
Case clone1	-----	-----	-----	-----	-----	I--	
Case clone2	-----	-----	-----	-----	-----	I--	
Case clone3	-----	-----	-----	-----	-----	I--	
Case clone4	-----	-----	-----	-----	-----	I--	
Case clone5	-----	-----	-----	-----	-----	I--	
	61					100	
CONSENSUS	LVTVVNSLS	ENRLEKTRDK	DEQVTFVPS	CLNENLTFE	SRSLRQVTE		
Case clone1	-----	-----	-----	-----	-----	---	
Case clone2	-----	-----	-----	-----	-----	---	
Case clone3	-----	-----	-----	-----	-----	---	
Case clone4	-----	-----	-----	-----	-----	L---	
Case clone5	-----	-----	-----	-----	-----	---	
	101			130		150	
CONSENSUS	SDLYLVTRH	ADVIPVRRR	DSRGSLLSEK	PVSYLGGSSG	GELLCEGSHA		
Case clone1	-----	-----	-G-----	-K-----	-----	---	
Case clone2	-----	-----	-G-----	-I-----	-----	---	
Case clone3	-----	-----	-G-----	-K-----	-----	---	
Case clone4	-----	-----	-G-----	-K-----	-----	---	
Case clone5	-----	-----	-G-----	-K-----	-----	---	
	151				195	200	
CONSENSUS	VGLRRAAVCT	RGNAKADDE	FVASEMTTR	SEVETDRSE	PAVEQTEQVR		
Case clone1	-----	-----	-----	-----	-----	K-----	15
Case clone2	-----	-----	-----	-----	-----	K-----	14
Case clone3	-----	-----	-----	-----	-----	K-----	1
Case clone4	-----	-----	-----	-----	-----	K-----	1
Case clone5	-----	-----	-----	-----	-----	K-----	1

Fig. 2. Comparison of the NS3 gene sequence in the 32 clones of telaprevir monotherapy. Consensus sequence was made from the 32 clones of 15 treatment-naïve Japanese patients with genotype 1b in our hospital. The number of clones within each sample of identical amino acid sequences is given on the right at the end of each sequence. Dashes indicate identical amino acid sequences.

Influence of Amino-Acid Polymorphism in the Core Protein on Progression of Liver Disease in Patients Infected With Hepatitis C Virus Genotype 1b

Mariko Kobayashi,^{1*} Norio Akuta,² Fumitaka Suzuki,² Tetsuya Hosaka,² Hitomi Sezaki,² Masahiro Kobayashi,² Yoshiyuki Suzuki,² Yasuji Arase,² Kenji Ikeda,² Sachiyo Watahiki,¹ Rie Mineta,¹ Satomi Iwasaki,¹ Yuzo Miyakawa,³ and Hiromitsu Kumada²

¹Research Institute for Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan

²Department of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan

³Miyakawa Memorial Research Foundation, Tokyo, Japan

The substitution of amino acid (aa) 70 of arginine for glutamine and/or that of aa91 of leucine for methionine in the core protein in patients infected with hepatitis C virus (HCV) genotype 1b is associated with a poor response to pegylated interferon and ribavirin. Factors influencing these substitutions were sought in 1,097 patients infected with HCV-1b who had not received antiviral treatment. HCV variants with Arg70 and Leu91 (wild-type) decreased, while those with Gln70 and/or Met91 (mutant types) increased with age ($P < 0.001$). Of the 1,097 patients, 464 (42.3%) were infected with the Gln70 variant and the remaining 633 patients with the Arg70 variant. The proportion of patients with the Gln70 variant increased with the severity of liver disease ($P < 0.001$), elevated γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) levels ($P < 0.001$) and a decrease in platelet count ($P = 0.008$). In univariate analysis patients with hepatocellular carcinoma, elevated aspartate aminotransferase (AST ≥ 58 IU/L) and γ -GTP (≥ 61 IU/L), and decreased albumin levels (< 3.9 g/dl) were more frequent in the patients with the Gln70 variant than the Arg70 variant ($P = 0.003, 0.005, < 0.001$, and 0.031 , respectively). In multivariate analysis HCC (odds ratio 1.829 [95% confidence interval 1.147–2.917]) and γ -GTP ≥ 61 IU/L (1.647 [1.268–2.139]) increased the risk for the Gln70 variant. In conclusion, the substitution of amino aa70 of Arg for Gln in patients infected with HCV-1b increases with age, and it is associated with severe liver disease accompanied by elevated AST and γ -GTP levels, as well as the development of hepatocellular carcinoma. *J. Med. Virol.* 82:41–48, 2010. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: cirrhosis; core protein; hepatitis C; hepatocellular carcinoma; interferon; ribavirin

INTRODUCTION

Worldwide, an estimated 170 million people are infected with hepatitis C virus (HCV) persistently [Cohen, 1999]. Decompensated cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) can develop in about 30% of patients infected with HCV [Alberti et al., 1999; Seeff, 2002]. HCV has six major genotypes and dozens of subgenotypes, and they have distinct geographic distributions and are associated with the progression of liver disease [Simmonds, 1995]. Host and virological factors can influence the severity of liver disease and the response to antiviral treatment. HCV infection in the childhood and women runs a milder course than that in adulthood and men, and the intake of alcohol accelerates the progression of liver disease [Poynard et al., 1997; Kenny-Walsh, 1999; Vogt et al., 1999; Wiese et al., 2000]. Genotypes 1 and 4 aggravate liver disease and decrease the response to antiviral treatment, in comparison with genotypes 2, 3, and 6 [Tsubota et al., 1994; Hui et al., 2003; Hadziyannis et al., 2004; Legrand-Abbravanel et al., 2005; Yuen and Lai, 2006]. High levels of HCV RNA in the serum can induce severe liver disease and decrease treatment response [Tsubota et al., 1994].

In Japan, genotype 1b in a high viral load (> 100 KU/ml) accounts for $> 70\%$ of HCV infection, and decreases the treatment response in patients with chronic hepatitis C [Kumada et al., 2006]. Even with pegylated interferon (PEG-IFN) combined with ribavirin, the sustained virological response for longer than 24 weeks after the withdrawal of treatment is achieved merely in

Grant sponsor: Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

*Correspondence to: Mariko Kobayashi, BS, Research Institute for Hepatology, Toranomon Hospital, 1-8-1, Kajigaya, Takatsuki, Kawasaki City 213-8587, Japan.

E-mail: vj7m-kbys@asahi-net.or.jp

Accepted 18 July 2009

DOI 10.1002/jmv.21629

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

50% of the patients with HCV-1b in high levels [Manns et al., 2001; Fried et al., 2002]. It is necessary to predict the response to PEG-IFN/ribavirin before the start of antiviral therapy, to avoid severe side-effects in the patients who will barely gain sustained virological response.

The core protein of HCV is coded for by the C gene, and consists of 191 amino acids (aa) [Rosenberg, 2001]. Although the core protein is conserved better than the other structural and non-structural proteins of HCV, polymorphisms of core protein are known, and they influence the response to antiviral treatment. In patients infected with HCV-1b, for example, the substitution of arginine at position 70 (Arg70) for glutamine (Gln70) and that of leucine at position 91 (Leu91) for methionine (Met70) decrease sustained virological response in the patients with chronic hepatitis C who are treated with PEG-IFN/ribavirin and increase the development of HCC [Akuta et al., 2007a,b,d, 2008].

In the Department of Hepatology at the Toranomon Hospital in Metropolitan Tokyo, the amino-acid sequence of the core-protein was determined in 1,079 patients infected with HCV-1b who had not received antiviral treatment. The substitution of Arg70 for Gln70 and that of Leu91 or Met 91 were correlated with the age at presentation, liver function tests and the severity of liver disease. Based on the results obtained, Gln70 would contribute to the progression of chronic hepatitis C.

MATERIALS AND METHODS

Patients

During 1966–2008, 1,097 patients infected with HCV-1b visited the Department of Hepatology at the Toranomon Hospital in Metropolitan Tokyo. They were: (1) negative for hepatitis B surface antigen by radio-immunoassay (Dainabot, Tokyo, Japan) or antibody to human immunodeficiency virus type-1; (2) positive for anti-HCV by a third-generation enzyme immunoassay (Chiron Corp., Emeryville, CA) and HCV RNA by the polymerase chain reaction (PCR) (Cobas AmpliCor HCV Monitor ver.2.0, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan); (3) infected with HCV genotype 1b but not with other genotypes; (4) without previous antiviral treatment; (5) without other forms of hepatitis, including hemochromatosis, Wilson's disease, primary biliary cirrhosis, alcoholic liver disease and autoimmune liver disease; and (6) had serum samples stored at -80°C . Of the 1,097 patients, 778 (70.9%) had chronic hepatitis, 221 (20.1%) cirrhosis, and 98 (8.9%) HCC. Amino acids in the core protein at positions 70 and 91 were determined, and were correlated with liver disease and biochemical and virological markers. Informed consent was obtained from each patient in this study, and the protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected by approval by Ethic Committee of the institution.

J. Med. Virol. DOI 10.1002/jmv

Histopathological Diagnoses of Liver Disease

Liver biopsy was performed under laparoscopy by a modified Vim Silverman needle (Tohoku University style, Kakinuma Factory, Tokyo). The sample was fixed in 10% formalin, and was stained with hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, silver impregnation, and periodic acid-Schiff. It contained at least six portal areas. The pathological diagnosis was made by one of the authors (H.K.) who was blinded to the clinical data. Chronic hepatitis was diagnosed based on the scoring system of Desmet et al. [1994]. Cirrhosis was diagnosed by imaging on ultrasonography (US), computed tomography (CT), or magnetic resonance imaging (MRI). HCC was diagnosed by US and/or CT. Angiography was performed when HCC was strongly suspected by US, CT, MRI, or liver biopsy. An increasing trend of tumor markers was taken into consideration for the diagnosis of HCC.

Determination of Amino-Acid Substitutions in the Core Protein

Amino acid (aa) at position 70 of Arg or Gln and aa91 of Leu or Met were determined by PCR with primers specific for each of them [Okamoto et al., 2007]. It is highly reproducible, and has a sensitivity of 94.4% in the determination of aa70 or aa91 in samples with HCV RNA titers > 10 KIU/ml. The concordance of the results of this method with those of direct sequencing reached 97.1%. Amino acids at positions 70 and 91 were confirmed by direct sequencing of most samples [Akuta et al., 2005].

Statistical Analysis

Changes of Arg70/Leu91 (wild-type) and Gln70 and/or Met91 (mutant types) with age were analyzed by the Cochran–Armitage trend test (SAS version 9.1.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC). Frequencies were compared between groups by the Kruskal–Wallis test and Fisher's exact test. Univariate and multivariate logistic regression analyses were used for the evaluation of factors independently associated with the substitution of aa70. They included the following ten variables: age, sex, liver disease, platelet count, hemoglobin, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), and substitution of aa at position 91 in the core protein. Each variable was transformed into categorical data consisting of two simple ordinal numbers for univariate and multivariate analyses. Variables that achieved statistical significance on univariate analysis were tested by the multivariate Cox proportional hazard model to identify independent factors. Statistical comparisons were performed using SPSS ver.11.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). A *P*-value < 0.05 by the two-tailed test was considered significant.

RESULTS

Clinical and Virological Characteristics of the 1,097 Patients Who Were Infected With HCV-1b

Table I lists the baseline characteristics of the 1,097 patients who were infected with HCV-1b and had not received antiviral treatment. They had the median age of 60 years and included 590 (53.8%) men. The median transaminase levels were elevated, and alpha-fetoprotein was within the normal limit ($<10 \mu\text{g/L}$). The majority of the patients (70.9%) had chronic hepatitis, while HCC had developed in 8.9% of the patients. Amino acids at positions 70 and 91 in the core protein were both the wild-type (Arg70 and Leu91) in 37.6% of them, and both mutant types (Gln70 and Met91) in 16.4%. The Gln70 variant was detected in 464 of the 1,097 (42.3%) patients.

The Prevalence of Amino-Acid Substitutions Stratified by Age and Sex

The 1,097 patients infected with HCV-1b were classified into three age groups, and the prevalence of Arg70/Leu91 (wild-type) and that of Gln70 and/or Met91 (mutant types) were compared (Fig. 1). Arg70/Leu91 decreased with age by trend analysis, from 63.6% in the patients aged ≤ 30 years to 36.6% in those ≥ 41 years ($P < 0.001$ by the Cochran–Armitage trend test). Table II lists the prevalence of the Gln70 variant in men and women stratified by the age. There were no sex differences in the prevalence of the Gln70 variant.

The Prevalence of the Gln70 Variant in Patients With Different Liver Diseases

Figure 2 compares the prevalence of the Gln70 variant among patients infected with HCV-1b who presented with different liver diseases at the baseline. The prevalence of the Gln70 variant increased with the progression of liver disease from chronic hepatitis

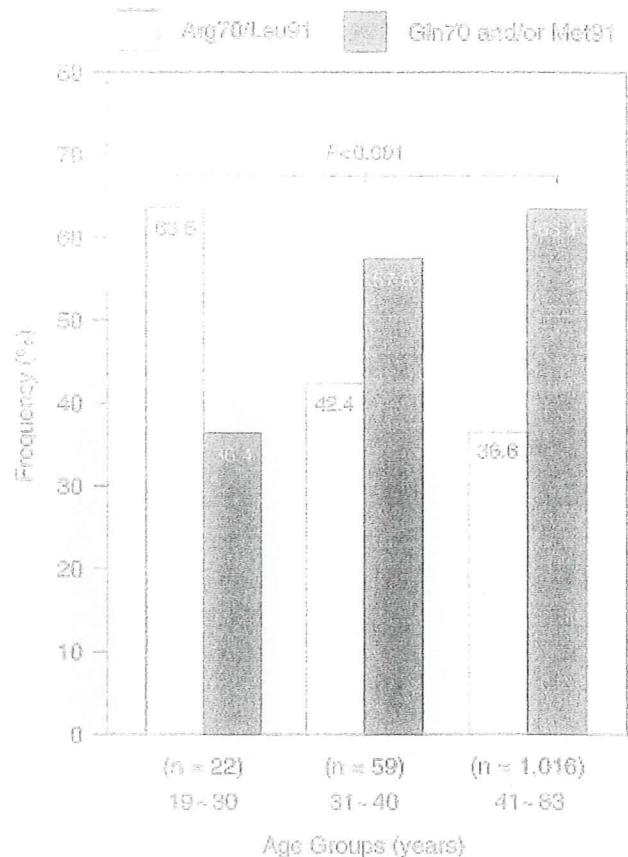


Fig. 1. The age-specific prevalence of Gln70 in treatment-naive patients infected with HCV-1b.

(32.6%) to cirrhosis (43.0%) and HCC (53.1%) ($P < 0.001$ by the Kruskal–Wallis test). In patients with cirrhosis, the 126 patients with the Arg70 variant were aged with the mean of 62 years (range: 32–78 years) in comparison with the 95 patients with the Gln70 variant who were aged 59 years (25–80). In patients with HCC, the 47 patients with the Arg70 variant were aged with the mean of 66 years (range: 37–81 years) in comparison with the 51 patients with the Gln70 variant who were aged 66 years (46–78).

TABLE I. Clinical and Virological Characteristics of the 1,097 Patients Who Were Infected With Hepatitis C Virus of Genotype 1b

Age (years)	60 (19–83)
Men	590 (53.8%)
Follow-up period (years)	3 (3–23)
Hemoglobin (g/dl)	14.0 (4.5–26.8)
Platelets ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	15.4 (3.0–34.1)
Aspartate aminotransferase (IU/L)	58 (8–617)
Alanine aminotransferase (IU/L)	69 (3–776)
Alpha-fetoprotein ($\mu\text{g/L}$)	6 (2–65,700)
Liver disease	
Chronic hepatitis	778 (70.9%)
Cirrhosis	221 (20.1%)
Hepatocellular carcinoma	98 (8.9%)
Amino acids in the core protein	
Arg70/Leu91 (double wild-type)	412 (37.6%)
Gln70/Leu91 (mutant type)	234 (25.9%)
Arg70/Met91 (mutant type)	221 (20.1%)
Gln70/Met91 (double mutant type)	180 (16.4%)

Values are the median with range in parentheses or the number with percentage in parentheses.

TABLE II. Frequency of Gln70 in the Core Protein in Patients Infected With HCV-1b Stratified by Age and Sex

Age (years)	Men	Women	Differences
19–30	23.5% (4/17)	20% (1/5)	1.0
31–40	34.1% (14/41)	38.9% (7/18)	0.773
41–50	37.2% (45/121)	40% (14/35)	0.763
51–60	39.1% (72/184)	40.1% (63/157)	0.912
61–70	36.0% (62/172)	30.1% (74/246)	0.205
70–83	45.5% (25/55)	43.5% (20/46)	0.342
Total	37.6% (222/590)	35.3% (179/507)	0.451