

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）
分担研究報告書

データマイニング手法を用いた効果的な治療方法に関する研究

Peg-IFN α -2b/RBV併用療法において、1週目にHCV-RNAが
1.2 LOG/ml未満である症例に対する8週間短縮投与の検討

研究分担者 佐藤 丈頭 国立病院機構小倉医療センター 肝臓病センター部長

研究要旨 Peg-IFN α 2b/RBV併用療法において、Peg-IFN α 2b初回半量投与にて1週目のHCV-RNA量が1.2 LOG/ml未満であった症例13例（1群 3例、2群 10例）に対して8週間の短縮投与をおこなった。現時点で13例中10例のSVRを確認、2例で終了3ヶ月後のHCV-RNA陰性を確認、残り1例も終了2ヶ月後のHCV-RNA陰性を確認し、再燃した症例はない。Peg-IFN α 2b初回半量投与にて1週目のHCV-RNA量が1.2 LOG/ml未満である症例においては、Peg-IFN α 2b/RBV併用療法の治療期間は8週間で十分である可能性がある。

研究協力者

國吉 政美	小倉医療センター
古賀荒太郎	小倉医療センター
大江 真里	小倉医療センター

今回、我々はPeg-IFN α 2b初回投与量を標準投与量の半量にて開始し、1週目のHCV-RNA量が1.2 LOG/ml未満であった極めて治療反応性が良い症例のうち、8週間短縮投与で治療したものの治療成績について検討した。

A. 研究目的

C型慢性肝炎のPeg-IFN α 2b/RBV併用療法において、治療反応性は症例によって大きく異なるが、極めて治療反応性が良い症例に対しては、現在の標準的な投与期間では過剰投与である可能性がある。

我々は治療反応性を加味したIFN治療の指標としてIFN-AC比＝（全治療期間のIFN総投与量）/（HCV-RNA陰性化時までのIFN総投与量）を提案し、アンプリコア定性法陰性を基準としたIFN-AC比が6倍であれば約80%のSVRが得られることを示してきた。

この考えによると、投与開始1週目のHCV-RNA量が1.2 LOG/ml未満である治療反応性が極めて良い症例は、8週間の治療でも少なくとも80%以上のSVRが期待できることになる。

B. 研究方法

平成20年4月から平成21年12月までに当院では93例（1群 61例、2群 32例）のPeg-IFN α 2b/RBV療法を導入した。当院では初回投与のみPeg-IFN α 2bの投与量を標準投与量の半量としているが、半量投与にも関わらず1週目にHCV-RNAが1.2 Log IU/ml未満であった症例が16例あった（1群5例、2群11例；検出せず7例、1.2 Log IU/ml未満9例）。これらの症例に対して、①8週間で一旦投与を終了し、万一再燃すれば再治療するプランと②初めから標準的な投与期間を投与するプランを示し、患者さんに選択させた。患者の希望により、8週間で投与を終了した症例について検討した。平成21年末の時点で効果判定をおこなった。

C. 研究結果

Peg-IFN α 2b/RBV 投与開始1週目にHCV-RNAが1.2 Log IU/ml未満であった16例のうち13例が8週間で投与を終了するプランを選択した。13例中2例は副作用が強く、8週間を超えての治療継続は難しいと考えられる症例であった。

8週間短縮投与をおこなった13例中10例でSVRを確認、2例で終了3ヶ月後のHCV-RNA陰性を確認、残り1例も終了2ヶ月後のHCV-RNA陰性を確認した。現時点で再燃した症例はない。

表. Peg-IFN+RBV療法を8週間で終了した症例

	年齢(才)	性	群別	ウイルス量 (LOGIU/ml)			判定
				直前	開始1週目	開始2週目	
1	59	女	2A	4.7	検出せず		SVR
2	73	男	2群	2.2	検出せず		SVR
3	18	男	2A	5.1	<1.2+	検出せず	SVR
4	75	男	2A	4.0	<1.2+	検出せず	SVR
5	75	男	2A	4.6	検出せず		SVR
6	70	男	1B	5.2	<1.2+	検出せず	SVR
7	45	男	2B	2.7	検出せず		SVR
8	64	女	2A	3.5	検出せず		SVR
9	67	女	2群	5.2	<1.2+	検出せず	SVR
10	25	女	2A	4.3	検出せず	検出せず	SVR
11	67	男	2A	4.0	検出せず	検出せず	終了3ヶ月陰性
12	65	女	1B	2.7	検出せず	検出せず	終了3ヶ月陰性
13	33	男	1B	4.1	検出せず	検出せず	終了2ヶ月陰性

D. 考察

Peg-IFN α 2b/RBV併用療法はC型慢性肝炎の標準的な治療法であり、その治療目標はSVRである。患者はSVRを達成できれば発癌率の低下など様々な恩恵を受けることができる。いっぽう、Peg-IFN/RBV併用療法の標準的な治療期間は24~72週間と長く、高額な薬剤費と様々な副作用が患者さんの負担となる。

Peg-IFN/RBV併用療法における治療反応性は症例によって大きなばらつきがあるが、治療反応性が極めて良い症例においては短縮投与でもSVRを達成できる可能性がある。

本研究ではPeg-IFN α 2b初回半量投与にて1週目のHCV-RNA量が1.2 LOG/ml未満

である治療反応性が極めて良い症例に対して8週間で治療を終了したが、10症例連続してSVRしている。このことから、初回半量投与にて1週目のHCV-RNA量が1.2 LOG/ml未満である症例の、Peg-IFN α 2b/RBV併用療法8週間投与のSVR率は少なくとも74%以上である(帰無仮説: SVR率が74%未満であれば、10例連続でSVRである確率=0.74¹⁰<0.05、棄却される、有意水準5%)。

8週間で一旦投与を終了し、万一再燃すれば再治療するプランは、24週間の標準投与と比較すると、再燃すれば8週間の投与が無駄になるが、SVRすれば16週間の無駄な投与が回避できるプランである。対象を絞り込めれば、8週間で一旦投与を終了し、万一再燃すれば再治療するというプランが医療経済上も有用な治療プランとなりうるものと考えられる。

E. 結論

Peg-IFN α 2b初回半量投与にて1週目のHCV-RNA量が1.2 LOG/ml未満であるウイルス反応性が極めて良い症例においては、Peg-IFN α 2b/RBV併用療法の治療期間は8週間で十分である可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 佐藤丈顕. ウイルス反応性が極めて良い症例に対するC型慢性肝炎インターフェロン短縮投与の試み. 第45回日本肝臓学会総会 神戸 2009年6月4日

2) 佐藤丈顕. IFN-AC比にもとづくC型慢性肝炎インターフェロン短縮投与の試み. 第63回国立病院総合医学会 仙台 2009年10月24日

G. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

データマイニング手法を用いた効果的な治療方法に関する研究

慢性C型肝炎に対するIFN治療著効判定後、HCV再陽性化を認めた2例

研究分担者 米田 俊貴 国立病院機構京都医療センター 消化器科

研究要旨 従来、Hepatitis C Virus (HCV) に対するインターフェロン (IFN) 治療の治療効果判定は最終投与から6ヶ月後のPCR反応でなされていたが、著効判定がなされたにも関わらず、その後HCV-RNAの再出現を認める例が報告されている。今回、著効判定後にHCV再陽性化に伴って肝炎再燃を認めた2症例を経験した。

症例はともに60代女性。1例はセログループ1、低ウイルス量であり、PEG-IFN単独治療50週施行後著効判定に至ったが、終了21ヶ月後にALT異常を伴うウイルス再出現を認めた。ウイルスジェノタイプは2aで、投与前のウイルスと矛盾しない。リバビリンを併用して再治療を行い、再び著効を得た。もう1例はジェノタイプ1b、高ウイルス量であり、他院にてリバビリン併用PEG-IFN治療を48週施行後著効判定に至った。投与終了17週でALT異常を伴うウイルス再出現を認めた。現在無治療にて経過観察中。

2例ともにリアルタイムPCRでも検出シグナル陰性が確認されており、PCRの感度不足による偽陰性ではない。同様の報告は国内国外から散発的になされているが、恐らく著効例中1%以下と見積もられ、多数例の解析はなされていない。

研究協力者

国立病院機構京都医療センター 消化器科
前川高天、勝島慎二、島 伸子、水本吉則、
安立英矢、友野輝子、江坂直樹、遠藤文司、
太田義之、太田 励、田中義人、森本浩之、
黒田エリ子

おける全貌がつかめているとは言えない。今回当施設においてかような症例2例が経験されたので、これらを報告することにより、発生頻度を含めた実態解明の一助としたい。

B. 研究方法および結果

症例1は64歳女性。セログループ 2、HCV-RNA 4.2 KIU/mlという2型低ウイルス量の慢性C型肝炎に対し、2005年にPEG-IFN α 2aによる単独療法がなされた。投与前の検査成績は表1に示した通りだが、血小板低下や4型コラーゲン7Sの増加など肝線維化進行を疑わせる所見を認めていた。

A. 研究目的

HCVに対するIFN治療の著効判定後にHCV再出現は、従来僅少と考えられていたが、長期経過に伴い諸施設で少数ずつが経験されるようになってきている。しかしその全てが報告されているわけではなく、わが国に

PEG-IFN α 2aの一回投与量は90 μ gとし、リバビリンの併用は行わなかった。治療開始後4週でHCV-RNAは陰性化し、その後血球減少や軽度自覚症状を認めたため、投与間隔を広めるといった対処がなされた。総投与期間50週で治療は終了し、6ヶ月後にAmplicor PCR法でHCV-RNA陰性を確認し、著効と判定した。

その後、外来で定期的に経過を観察しており、2006年にはステージ1の肝細胞癌に対し、ラジオ波焼灼術を施行している。2007年11月(投与終了から21ヶ月)、ALT上昇を認め、HCV-RNA陽性が確認された。HCVジェノタイプは2aであり、投与前のセログループと矛

盾せず、明らかな感染イベントは認めていなかったことより、著効判定後のウイルス再陽性化と判断した。リバビリン併用PEG-IFN α 2bの24週投与が実施され、再度著効判定に至った。現在再投与終了から13ヶ月経過しているが、再々陽性化は観察していない。

保存血清を用いてリアルタイムPCR法によるウイルス量の評価を追加した。投与前では4.9 log IU/mlであり、投与4週時点では定量感度以下ながらシグナル検出を認めていた(Amplicor PCRでは陰性と判定していた)。その後PCRシグナルは検出されなくなり、投与終了時・著効判定時いずれも陰性と判定されている。

表1. 症例1 IFN投与前検査成績

WBC	2,900	/ μ l	TP	6.3	g/dl
Neut.	1,000	/ μ l	Alb	3.5	g/dl
Hb	11.9	g/dl	T-Bil	1.4	mg/dl
PLT	106,000	/ μ l	AST	122	IU/l
			ALT	103	IU/l
AFP	9	ng/ml	ALP	583	IU/l
PIVKA-II	15	mAU/ml	γ GTP	43	IU/l
ferritin	86	ng/ml			
4型コラーゲン7S	12.0	ng/ml	HCV-RNA	111	KIU/ml
			HCV genotype	group 2	

症例2は62歳女性。ジェノタイプ1b、HCV-RNA 5000 KIU/mlという1型高ウイルス量の慢性C型肝炎に対し、他院にて2007年にPEG-IFN α 2bによる併用療法がなされた。投与前の検査成績は表3に示した通りで、線維化は比較的軽度と推測される。他院施行のため治療の詳細は不明だが、甲状腺機能低下などの副作用に対し適宜投与量減量がなされるも、型通りの48週投与がなされた。HCV-RNAは投与7週で陰性化した。投与終了後のHCV検出はリアルタイムPCR法でな

され、6ヶ月後に著効判定に至った。

以後外来で観察されていたが、投与終了より17ヶ月後に第3の施設でALT上昇が観察され、PCRにてウイルスの再陽性化が認められたとして当院紹介となった。来院時若干ウイルス減少傾向にあったため、即座にIFN再導入を行うことは避け、経過を観察した。ALT異常は次第に改善したが、ウイルス血症は遷延し、今後再治療の必要はあると思われる。

表2. 症例2 HCV再出現時検査成績

WBC	3,200	/ μ l	TP	7.2	g/dl
Neut.	1,800	/ μ l	Alb	4.4	g/dl
Hb	11.2	g/dl	T-Bil	1.1	mg/dl
PLT	144,000	/ μ l	AST	169	IU/l
			ALT	174	IU/l
AFP	3	ng/ml	ALP	493	IU/l
PIVKA-II	12	mAU/ml	γ GTP	49	IU/l
ferritin	32.4	ng/ml			
			HCV-RNA	27.0	KIU/ml
			HCV genotype	2a	

表3. 症例2 IFN投与前検査成績

WBC	6,800	/ μ l	TP	7.2	g/dl
Neut.	2,300	/ μ l	Alb	4.3	g/dl
Hb	14.6	g/dl	T-Bil	0.9	mg/dl
PLT	216,000	/ μ l	AST	32	IU/l
			ALT	39	IU/l
AFP	6.2	ng/ml	ALP	261	IU/l
			γ GTP	21	IU/l
ANA	40倍未満				
			HCV-RNA	5000以上	KIU/ml
TSH	7.58	μ IU/ml	HCV genotype	1b	

表4. 症例2 HCV再出現時検査成績

WBC	4,500	/ μ l	TP	7.9	g/dl
Neut.	2,200	/ μ l	Alb	4.9	g/dl
Hb	14.7	g/dl	T-Bil	1.1	mg/dl
PLT	202,000	/ μ l	AST	66	IU/l
			ALT	139	IU/l
AFP	5	ng/ml	ALP	275	IU/l
PIVKA-II	27	AU/ml	γ GTP	34	IU/l
ferritin	461.9	ng/ml			
			HCV-RNA	4.5	log IU/ml
			HCV genotype	1b	

C. 考察

両症例とも高齢女性であるが、その他に関してはジェノタイプ、ウイルス量、線維化の程度、初回治療など異なっており、共通する点は少ない。

まず想定されるのは再感染だが、1例目は投与前のセログループと投与後のジェノタイプに矛盾が見られない。系統樹解析は未施行だが今後施行を予定している。再感染の機会として明らかなものは認めていない。2例

目はメジャージェノタイプである1b症例であり、前後が一致していても再感染の否定根拠としては弱い。さらに初回治療前の血清が確保されておらず、今後系統樹解析も不可能である。ただ、1例目同様に再感染の機会は認めていない。次に考えられるのはPCRの感度が不十分であることによる偽陰性であるが、1例目に対しては保存血清による追加解析で投与前・終了時・著効判定時にリアルタイムPCRでもRNAが検出されなかった。2例

目は保存血清の解析は不可能だが、投与終了以降はリアルタイムPCRでのデータとなっており、感度不足と判断することは難しい。これらより、既報の再陽性化例の多くをPCRの感度不足と結論することは困難であり、現存する手法では検出不可能な微量HCVが体内のいずこかに存在した可能性が示唆される。

既にいわき市立総合磐城共立病院の中山らにより、著効判定後のRNA再陽性化の報告がなされており（肝臓 2006年）、この時点での本邦報告例は13例。うちリバビリン併用症例は6例、男女比は男性10、女性3であった。しかしこうした報告症例は全体のごく一部と考えられ、同様の症例は恐らく多くの施設に少数ずつ散在するのではないかと予想される。海外からの報告ではHCVの再出現が1%を超えるものもあるが、解析対象症

例が少なく、実態を正確に反映しているとは言い難い。正確な再陽性化率については施設横断的な実数調査が必要となるであろう。

このような知見から、たとえ持続著効と判定されたとしても、それがHCVの完全排除と結論することは困難である。従って、著効判定を治療のゴールとすることなく、その後も再陽性化を念頭に置いてフォローアップを継続することが必要となる。しかしその一方、再陽性化率は臨床的には低率にとどまっております、かかる症例の存在を根拠に既存の治療法に欠陥があると論じるべきではない。

D. 研究発表

なし。

E. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

データマイニング手法を用いた効果的な治療方法に関する研究

当院におけるB型急性肝炎ウイルス遺伝子型の検討

研究分担者 島田 昌明 国立病院機構名古屋医療センター 消化器科医長

研究要旨 今回、2008年3月から2009年12月まで当院で入院治療を行った9例（男性8例、女性1例）のB型急性肝炎におけるgenotypeについて検討した。Genotype A：5例（55.6%）、B：1例（11.1%）、C：3例（33.3%）であった。Genotype Aではgenotype B、Cと比べALT値は比較的 low（ 1864 ± 697 、 2043 ± 815 IU/ml）、PT値は低い傾向にあった（ 77 ± 21 、 99 ± 11 %）。HBs抗原の消失までの期間はgenotype Aで長くなる傾向にあった（ 4.8 ± 3.3 、 2.0 ± 0 ヶ月）。重症化の懸念があった1例にEntecavirを投与した。感染経路としてgenotype Aの1例（20%）は同性間性交渉であったが、それ以外は異性間性交渉が原因と推察された。B型急性肝炎におけるgenotype Aは55.6%と高頻度であり、遷延化例や慢性化例からの二次感染の増加が予想されるなか、実態把握と適切な対応は欠かせない。

研究協力者

名古屋医療センター 消化器科
岩瀬弘明、平嶋 昇、都築智之、日比野祐介、
渡邊久倫、龍華庸光、斎藤雅之、玉置 大、
寺尾美咲、神谷麻子、浦岡正尚

した。HBV genotypeの判定はPCR-RFLP法で測定した。

C. 研究結果

男性8例、女性1例で平均年齢は38.3（24-56）歳であった。Genotype A：5例（55.6%）、B：1例（11.1%）、C：3例（33.3%）であった（表1）。

臨床検査値は、genotype A（A群）、genotype B、C（BC群）の順にALT最高値（ 1864 ± 697 、 2043 ± 815 ）IU/ml、T.Bil最高値（ 6.97 ± 4.92 、 6.81 ± 6.21 ）mg/dl、PT最低値（ 77 ± 21 、 99 ± 11 ）%とA群でALT値は比較的low、PT値は低い傾向にあった。BC群では測定可能であった3例では急性肝炎発症後2ヶ月以内にHBs抗原は陰性化し、そのうちの2例はHBs抗体も陽性化した。A群では全例HBs抗原は陰性化した。BC群では全例HBs抗原は陰性化した。A群では平均4.8（1~10）ヶ月を要した。HBs

A. 背景と目的

近年、B型急性肝炎におけるgenotype Aの頻度が増加しており、他のgenotypeと比べ肝炎の程度は軽いものの慢性化率が高いことが報告されている。今回、当院におけるB型急性肝炎genotypeについて検討した。

B. 研究方法

2008年3月から2009年12月まで入院治療をおこなったB型急性肝炎9例を対象とした。急性肝炎で発症し、HBs抗原陽性、IgM-HBc抗体陽性、他の肝炎の原因が血清学的検査で否定されている症例をB型急性肝炎と診断

抗体は5例中3例で陽性化している（表2）。

A群の58歳男性はPT値が45%まで低下し重症化の懸念があったため、HIV抗体陰性を確認後、第8病日よりEntecavirの内服を開始した。内服開始後4ヶ月目でHBs抗原陰性となり、Entecavirの内服は中止した。その後、HBs抗体陽性を認めた。

感染経路に関してA群は日本人女性4例、日本人男性1例との性行為であり、BC群では不明である1例（女性症例）以外は日本人女性2例、中国人女性1例との性行為と推測された。

D. 考察

HBVキャリアが減少しているなかB型急性肝炎が増加している原因として、genotype Aによるものが主体になりつつあることが報告されている。

Genotype AはALTが低値、HBV DNA量が高値であると報告されているが、今回の当院での検討でも同様な傾向がみられた。また、PTが低値であったことから、genotype Aではウイルス量が多いが肝細胞障害は比較的軽度で、ウイルス排除が遅延し慢性化しやすく、なかには重症化する症例も存在するもの

表1. 症例一覧（初診時検査成績）

症例	年齢 (歳)	性	Genotype	ALT (IU/L)	T-Bil (mg/dl)	PT (%)	HBs抗原 (S/N)	HBe抗原 (S/c)	HBe抗体 (%INH)	IgMHBc抗体 (S/c)	HBV DNA (Log copies/ml)
1	35	M	A	2738	10.62	102	2410	292	0	34	6.3
2	56	M	B	770	3.19	106	6888	160	0	12	未測定
3	25	M	A	719	0.98	83	801	473	0	32	7.1
4	40	M	C	2448	9.72	108	6055	244	0	31	3.7
5	30	M	C	2480	4.38	94	5439	0.97	89	20	5.2
6	58	M	A	1102	3.59	57	91210	1581	0	37	>8.8
7	24	M	A	2390	5.03	70	111643	376	0	31	8.2
8	46	F	C	821	1.28	105	149	0.47	87	6	2.1
9	44	M	A	1793	1.67	88	80663	1076	0	27	8.6

表2. Genotype別の比較

	Genotype A (n=5)		Genotype BC (n=4)	
ALT (IU/L) 初診時	1748±84	(719-2738)	1526±1092	(409-2480)
最高値	1864±697	(1102-2738)	2043±815	(821-2480)
T-Bil (mg/dl) 初診時	4.37±3.83	(0.98-10.62)	4.64±3.61	(1.28-9.72)
最高値	6.97±4.92	(1.28-12.53)	6.81±6.21	(1.28-15.72)
PT (%) 初診時	80±17	(57-102)	103±6.2	(94-108)
最低値	77±21	(45-102)	99±11	(83-105)
ALT正常化までの月数	2.5±1.3	(1-4)	2.25±0.8	(2-3)
T-Bil正常化までの月数	3.2±1.8	(1-5)	1.75±0.95	(1-3)
HBs抗原陰性化までの月数	4.8±3.3	(1-10)	2.0±0	(2-2) (1例不明)
HBs抗体陽性化までの月数	7.0±5.2	(1-10) (2例陰性)	7.0±2.8	(5-9) (1例陰性、1例不明)
HIV陽性例	0/5		0/3 (1例未測定)	

と考えられた。

今回、genotype Aの症例で1例はPT：45%と重症化が懸念され、Entecavirの投与を要した。Genotype AのB型急性肝炎では今後、核酸アナログ治療を必要とする症例の増加が予想され、投与方法等の治療方針が確立されることが望まれる。

感染経路としてgenotype Aは他の遺伝子型と比較して同性間性交渉が多いとされているが、今回の検討でも5例中1例（20%）は同性間性交渉であった。それ以外の4例は日本人女性との異性間性交渉が原因であった。今後、急性肝炎の遷延化例や慢性化例からの二次感染の増加が危惧されることから、HBVウイルスが排除されるまでは慎重に経過観察をおこなう必要があり、また、経過によっては抗ウイルス薬の投与が必要となる場合があることが考えられる。

今回はHIVとの重感染例は認めなかったが、HIV感染例ではHBVの慢性化率が21%と高いと報告されている。また、核酸アナログ単独治療はHIVの耐性株を産生し禁忌となっており、B型急性肝炎症例に核酸アナログ治療をおこなう前にHIV抗体検査は可能な限り必要であると考えられる。

今回の検討でB型急性肝炎におけるgenotype Aの割合は55.6%と高いものであり、急速にgenotype Aの感染が広がっているものと思われる。このような実態を把握し診療にあたることは大変重要である。

E. 結語

当院におけるB型急性肝炎genotype Aは9例中5例（55.6%）であった。

Genotype Aはgenotype B、Cと比べHBs抗原消失までの期間は長くなる傾向にあった。

PT値が低く重症化が懸念されEntecavirを投与した症例を経験した。

Genotype Aの感染経路は全例で日本人間の性交渉であり、genotype Aの増加、蔓延化が危惧された。

B型急性肝炎の診療にあたりウイルス遺伝子検査をおこなうことが望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 齋藤雅之、平嶋 昇、遠藤伸也、玉置 大、龍華庸光、渡邊久倫、日比野祐介、都築智之、島田昌明、岩瀬弘明、後藤秀実：過去1年間の当院におけるGenotype A型 急性B型肝炎の検討（JDDW 2009国立京都国際会館、2009年10月15日）

G. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

データマイニング手法を用いた効果的な治療方法に関する研究

慢性C型肝炎の肝組織におけるSOCS3の意義

研究分担者 中尾 一彦 長崎大学医歯薬総合研究科
展開医療科学講座消化器病態制御学 教授

研究要旨 最近JAK/STATシグナル経路の負の制御因子の1つであるSOCS3がインターフェロン抵抗性と関係があることが示されている。

今回我々は肝内におけるSOCS3を免疫組織学的に検討し、臨床因子やインターフェロンの治療効果との比較検討を行った。SOCS3 scoreはAST、ALT、HOMAと有意な相関を示し、血小板とは有意な逆相関を示した。

SOCS3 scoreはSVR群でnon-SVR群に比較して有意に低かった。単変量解析と多変量解析ではインターフェロンの治療効果の有意な予測因子はSOCS3 (30%以下) と年齢 (60歳未満) であった。インターフェロン前の肝組織におけるSOCS3はやインスリン抵抗性と相関し、インターフェロンの治療効果の予測因子となりうると考えられた。

研究協力者

宮明 寿光 長崎大学病院消化器内科 助教

A. 研究目的

慢性C型肝炎の病態には、サイトカインシグナルがその病態の形成に大きくかかわっているとされている。インターフェロンのシグナル伝達はJAK/STAT経路が主流の経路とされている。最近JAK/STATシグナル経路の負の制御因子の1つであるSOCS3 (Suppressors of cytokine signaling3) がインターフェロン抵抗性と関係があることが示されている。今回我々は肝内におけるSOCS3を免疫組織学的に検討し、臨床因子やインターフェロンの治療効果との比較検討を行った。

B. 研究方法

当科にて慢性C型肝炎と肝生検にて診断をうけた59例を検討対象とした。すべての肝

組織をSOCS3の免疫染色を行い、染色された面積に応じて4段階評価 score 0 (0%)、score 1 (1~30%)、score 2 (31~50%)、score 3 (51%~) した。またC型肝炎の抗ウイルス作用にとって必要なリン酸化STAT1 (p-STAT1) の免疫染色を行い、その10mm²あたりの陽性核を算出しあわせて検討した。インターフェロン治療を行うことができた51例では、その治療効果と検討を行った。患者背景は表1に示す。

表1. 患者背景(59症例)

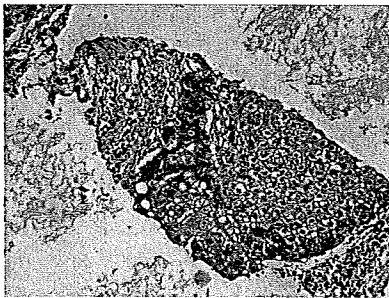
年齢 (years)	59.4±9.9
性別 (male:female)	32:27
AST (IU/L)	71±36
ALT (IU/L)	97±55
Plt (×10 ⁴ /ul)	16.7±4.8
BMI (kg/m ²)	22.4±2.4
HOMA-IR	1.90±0.87
LDL (mg/dl)	102±21
HCV genotype (1:2)	46:13
HCV viral load core protein (fmol /L)	6004 (20~24200)
Interferon response (n=51) (SVR: non SVR)	29:22

C. 研究結果

(1) C型慢性肝炎におけるSOCS3の免疫染色の結果 (図1)

図1に示すようにSOCS3は細胞質が染色され、門脈域周囲を中心として、染色された。SOCS3 scoreはScore0 (0%) 11例、Score1 (1~30%) 19例、Score2 (31~50%) 16例、Score3 (51%~) 13例であった。

図1.

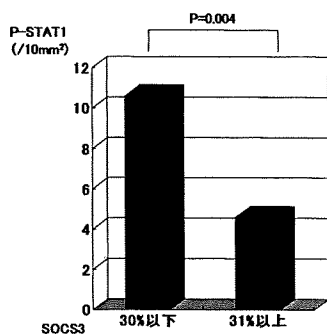


SOCS3 Score2の症例

(2) P-SAT1とSOCS3の関係

図2に示すようにSOCS3が30%以下の群では31%以上の群に比較して、有意にP-STAT1陽性の核が多かった (10.6 ± 8.8 vs. 4.6 ± 6.1 ; $P=0.004$)。

図2. P-STAT1とSOCS3の関連



(3) SOCS3と臨床因子の関係

SOCS3 scoreはAST、ALT、HOMAと有意な相関を示した ($r=0.373$, $p=0.003$, $r=0.337$, $p=0.008$, $r=0.339$, $p=0.008$)。一方血小板とは有意な逆相関を示 ($r=-0.273$, $p=0.037$) (表2)。

表2. SOCS3と各因子の比較

	r	p
Age	$r=0.200$	0.094
AST	$r=0.373$	0.003
ALT	$r=0.337$	0.008
Plt	$r=-0.273$	0.037
BMI	$r=0.151$	0.254
HOMA	$r=0.339$	0.008
LDL	$r=0.051$	0.708
Viral load	$r=0.51$	0.702

(4) SOCS3と病理学的因子の関係

SOCS3 scoreはgradingがsevereな症例がmildな症例に比較して有意に高く ($mild : severe = 1.4 \pm 0.5 : 1.9 \pm 0.3$)、stagingもsevereな症例がmildな症例に比較して有意に高かった ($mild : severe = 1.3 \pm 0.5 : 1.8 \pm 0.4$) (表3)。

表3. 各因子におけるSOCS3の値

	Value	p
Sex (male:female)	$1.7 \pm 0.8 : 1.3 \pm 1.2$	0.071
Genotype (1:2)	$1.5 \pm 1.0 : 1.4 \pm 1.1$	0.723
Grading (mild : severe)	$1.4 \pm 0.5 : 1.9 \pm 0.3$	0.010
Staging (mild : severe)	$1.3 \pm 0.5 : 1.8 \pm 0.4$	0.001

(5) 慢性C型肝炎における抗ウイルス治療とSTATのリン酸化の関係

peg-IFN α -2b+リビリンの治療を受けた51例のうち29例でSVRが得られた。SOCS3 scoreはSVR群でnon-SVR群に比較して有意に低かった (1.7 ± 1.1 vs. 2.5 ± 1.1 , $p=0.021$)。

単変量解析と多変量解析ではSOCS3 (30%以下) と年齢 (60歳未満) がSVRの有意な予測因子であった (オッズ比 10.888, $p=0.001$ vs. オッズ比 3.817, $p=0.045$) (表4、5)、Genotype 1型に限った検討でも単変量解析と多変量解析でSOCS3 (30%以

下)と年齢(60歳未満)がSVRの有意な予測因子であった(オッズ比 13.770, $p=0.003$ vs. オッズ比 6.658, $p=0.033$) (表6、7)。

表4. インターフェロン治療効果と各因子(51例)

	SVR 29 cases	No SVR 22 cases	P value
Sex (female)	10	12	0.250
Age (<60歳)	19	8	0.033
AST (≥ 70 IU/L)	11	10	0.890
ALT (≥ 70 IU/L)	16	11	0.933
Plt ($>15.0 \times 10^4$)	18	9	0.133
BMI (≥ 22 kg/m ²)	10	8	0.875
HOMA (≥ 2)	10	13	0.142
LDL (≥ 100 mg/dl)	21	12	0.186
Genotype (1b)	19	20	0.077
Viral load (≥ 300 fml/L)	24	22	0.263
Grading (severe)	3	5	0.414
Staging (severe)	8	11	0.080
SOCS3 ($\leq 30\%$)	20	4	0.0009

表5. インターフェロン治療効果の多変量解析

	オッズ比	P value
SOCS3 ($\leq 30\%$)	10.888	0.0001
Age (<60 years)	3.817	0.045

表6. Genotype 1型でのインターフェロン治療効果因子の検討(39例)

	SVR 19cases	No SVR 20cases	P value
Sex (female)	8	10	0.621
Age (<60歳)	13	6	0.030
AST (≥ 70 IU/L)	8	10	0.862
ALT (≥ 70 IU/L)	11	10	0.892
Plt ($>15.0 \times 10^4$)	12	8	0.260
BMI (≥ 22 kg/m ²)	7	8	0.899
HOMA (≥ 2)	6	11	0.249
LDL (≥ 100 mg/dl)	13	9	0.339
Viral load (≥ 300 fml/L)	14	20	0.326
Grading (severe)	3	5	0.752
Staging (severe)	6	9	0.594
SOCS3 ($\leq 30\%$)	14	4	0.002

表7. Genotype 1型におけるインターフェロン治療効果の多変量解析

	オッズ比	P value
SOCS3 ($\leq 30\%$)	13.740	0.003
Age (<60 years)	6.658	0.033

D. 考察

最近のHCVウイルスに対する抗ウイルス療法の進歩により、難治性のGenotype 1型の高ウイルス量においてもペグIFNとリビビリ療法により、50%の著効が得られるようになった。しかしながらインターフェロンの効果が見られない症例も存在する。インターフェロン治療効果のマーカーとしてはウイルス因子や宿主因子、薬剤投与量がいわれている。今回の検討では免疫組織学的に肝組織におけるSOCS3を検討し、治療効果因子となりうるかを検討した。

今回SOCS3は門脈領域を中心に染色された。SOCS3はTNF α やLPSのような炎症性サイトカインにより誘導されるとされており、今回の結果は門脈を介してこれらのサイトカインがSOCS3を誘導していることが示唆される。また内臓脂肪により誘導されるTNF α 等のadipocytokineがインスリン抵抗性を惹起するといわれており、HOMAとSOCS3が有意な相関関係にあった今回の結果は合致する。

今回SOCS3はAST、ALTと有意な相関にあり、gradingがsevereな症例ではそのscoreが高かったが、これらの結果はSOCS3は炎症の状態に影響を受けるという従来の検討と合致する。

SOCS3 scoreは血小板と有意な逆相関にあり、stagingがsevereな症例では有意に高かった。SOCS3は肝の増殖にとっては抑制因子とされており、今回の結果は線維化の進行により、肝再生が起こりにくいことを示しているのかもしれない。

今回の検討でSOCS3と年齢が有意なSVRの予測因子であった。SOCS3の陽性面積が30%以下でかつ60歳以下の症例は14症例あった。これら14例はすべてSVRであった。よってインターフェロン前の肝組織におけるSOCS3と年齢を組み合わせることにより、インターフェロンの治療効果を判断しうると考えられた。

E. 結論

インターフェロン前の肝組織における SOCS3はやインスリン抵抗性と相関し、インターフェロンの治療効果の予測因子となりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura S, Ichikawa T, Taura N, Shibata H, Takeshita S, Akiyama M, Motoyoshi Y, Ozawa E, Fujimoto M, Kawashimo H, Miyaaki H, Eguchi K, Nakao K. The level of fasting serum insulin, but not adiponectin, is associated with the prognosis of early stage hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2009 Dec;22(6):1415-24.
- 2) Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Eguchi S, Takatsuki M, Fujimoto M, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Kanematsu T, Eguchi K. Hepatitis C virus kinetics during the first phase of pegylated interferon-alpha-2b with ribavirin therapy in patients with living donor liver transplantation. *Hepatol Res.* 2009 Sep;39(9):856-64.
- 3) Miyaaki H, Zhou H, Ichikawa T, Nakao K, Shibata H, Takeshita S, Akiyama M, Ozawa E, Miura S, Eguchi K. Study of liver-targeted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chronically infected patients. *Liver Int.* 2009 May;29(5):702-7.
- 4) Takeshita S, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Shibata H, Matsuzaki T, Muraoka T, Honda T, Otani M, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, Fujimoto M, Eguchi K. A snack enriched with oral branched-chain amino acids prevents a fall in albumin in patients with liver

cirrhosis undergoing chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Nutr Res.* 2009 Feb;29(2):89-93.

5) Migita K, Sawakami-Kobayashi K, Maeda Y, Nakao K, Kondoh S, Sugiura M, Kawasumi R, Segawa O, Tajima H, Machida M, Nakamura M, Yano K, Abiru S, Kawasaki E, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Interleukin-18 promoter polymorphisms and the disease progression of Hepatitis B virus-related liver disease. *Transl Res.* 2009 Feb;153(2):91-6.

6) Fujimoto M, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Nagaoka S, Yatsushashi H, Kanematsu T, Eguchi K. The significance of enzyme immunoassay for the assessment of hepatitis B virus core-related antigen following liver transplantation. *Intern Med.* 2009;48(18):1577-83.

7) Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, Akiyama M, Miura S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Yamasaki H, Ikeda M, Kato N, Eguchi K. Interferon-alpha-induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J Gastroenterol.* 2009;44(8):856-63.

8) Taura N, Yatsushashi H, Nakao K, Ichikawa T, Ishibashi H. Long-term trends of the incidence of hepatocellular carcinoma in the Nagasaki prefecture, Japan. *Oncol Rep.* 2009 Jan;21(1):223-7.

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

データマイニング手法を用いた効果的な治療方法に関する研究

IFNと分子標的薬併用投与による肝癌細胞株増殖抑制

研究分担者 矢野 博久 久留米大学医学部病理学 教授

研究要旨 新規のDrug Delivery System (DDS) によるインターフェロン (IFN) の放出率とIFNと抗VEGFヒト化モノクローナル抗体であるベバシズマブ (アバスチン®) との併用による肝癌細胞の抗腫瘍効果について検討を行った。その結果、新規DDS中のIFNは、初期からDDS外に比較的多くの量が放出されることが判明した。ヌードマウス皮下にDDSを埋め込んだ場合の血中のIFNの半減期は、18.6時間であった。ヒトの皮下にOIFを投与した際の血中の半減期が5.7時間と報告されていることから、3倍程度延長はしているものの、薬物の放出速度のコントロールは不十分であった。ベバシズマブに関しては、*in vitro*で肝癌細胞に対して増殖抑制効果を認めなかった。ヌードマウス皮下移植ヒト肝癌に対する抗腫瘍効果は、ベバシズマブ、IFN、それぞれ臨床使用量の単独投与で比較的明瞭な効果が認められた。ベバシズマブによる抗腫瘍効果は血管新生阻害を介した作用と推察された。ベバシズマブ、IFN両者の併用投与では、抗腫瘍効果の増強は不明瞭であった。今後、ベバシズマブを含め種々の分子標的薬とIFNの併用により肝癌に対する抗腫瘍効果の増強作用の有無に関する検討が必要である。

A. 研究目的

IFNの新しい投与方法として新規のDrug Delivery System (DDS) の有用性を昨年より検討していたが、その薬剤放出率について今回追加検討した。また、IFNと分子標的薬の併用による抗腫瘍効果の増強作用に関して、今回、抗VEGFヒト化モノクローナル抗体であるベバシズマブ (アバスチン®) を用いて検討した。

B. 研究方法

A. 新規 DDSの薬剤放出率の検討

①*in vitro*での検討：10,000 IUのヒト天然型IFNのBALL-1 lymphoblastoid IFN- α (OIF、大塚製薬株式会社) を含有したヒア

ルロン酸-チラミンハイドロゲル (HA-Tyr gel) をdish上に固定し、培養液をいれて、経時的に培養液を採取し、放出されるIFN- α の量を測定した。

②*In vivo* (ヌードマウス) での検討：ヌードマウス皮下に 1.0×10^6 IUのIFN- α を含有したHA-Tyr gelを埋め込み、経時的にマウスから採血して、血清中のIFN- α の濃度を測定した。

B. ベバシズマブの単独及びIFN- α との併用による肝癌細胞の増殖に対する検討

①*in vitro*の実験：pegylated IFN- α 2a (pegasys®, 中外製薬) 単独、ベバシズマブ (アバスチン®, 中外製薬) 単独、両者併

用による肝癌細胞増殖抑制効果について72時間後にMTT assayで生細胞数を同定した。肝癌細胞株は、当教室で樹立したHAK-1B肝癌細胞株を使用した。

②HAK-1B肝癌細胞を800万個ヌードマウスの皮下に接種し、約1週間後腫瘍径が1cm前後になった時点で実験を開始した。IFNのみ投与群（C型慢性肝炎の治療に使用されるpegasys®の臨床投与量（180 μ g/body）に相当する 0.06 μ g/マウスのみを皮下投与）、ベバシズマブ週1回投与群（アバスチンの臨床投与量に相当する100 μ g アバスチン®/マウスのみ週1回腹腔内投与）、ベバシズマブ週2回投与群、IFNとベバシズマブそれぞれ週1回投与群、コントロール群（培養液皮下投与、生理食塩水腹腔内投与）を作成し実験を行った。23日目にsacrificeして、腫瘍重量を測定した。また、腫瘍の短径と長径を2、3日に一度行い、（短径） $2 \times$ 長径 $\times 1/2$ の式に当てはめて推定体積を求めてグループ間で比較した。

C. 研究結果

A. In vitroでは、1日目で既にゲル内の25%程度のIFN- α が培養液中に放出されその後、1/20程度の量が徐々に6日間で放出されていた。In vivoでは、皮下埋め込み後6時間の時点で既に血中濃度は最高値に達しており、12時間目で6時間目の2/3の濃度に、24時間で1/4の濃度になり、以後徐々に低下を示した。生物学的半減期は18.6時間であった。

B. In vitroにおいて、ベバシズマブは、直接的な肝癌の増殖抑制作用は示さず、IFNと併用投与してもベバシズマブによる相加・相乗的な増殖抑制作用は見られなかった。In vivoにおいては、IFN単独、ベバシズマブ単独週1回で、約50%程度増殖が抑制され、ベバシズマブのみ週2回投与では増殖が、約60%程度抑制された。IFNとベバシズマブの

併用は、それぞれの単独投与とほとんど変わらないか、軽度に増殖抑制効果が増強した。組織学的に壊死はIFNとベバシズマブの併用群で最も多く見られた。

D. 考察

新規DDSによるIFN- α の放出は、初期の段階で既に多く放出されていた。ヒトの皮下にOIFを投与した際の血中の半減期は5.7時間であり、HA-Tyr gelでは、18.6時間であったことから延長はしているものの、薬物の放出速度のコントロールは不十分であった。今後、別の材料により作製された類似のゲルを入手しており、同様に抗腫瘍効果や放出率を検討していく必要がある。ベバシズマブに関しては、in vitroで肝癌に対する増殖抑制効果が無いことから、in vivoの増殖抑制作用は、血管新生阻害を介した間接的な作用と考えられる。ベバシズマブとIFNとの併用による抗腫瘍効果の増強は不明瞭であったが、IFNとベバシズマブ併用群で壊死が多かったことから、今後、腫瘍組織の血管を含む病理組織像の詳細な検討が必要と思われる。また、ベバシズマブ以外の他の分子標的薬とIFNの併用検討も行う必要があると思われる。

E. 論文発表

1. 論文発表

1) Fujimoto M, Nakashima O, Komuta M, Miyaaki T, Kojiro M, Yano H: Clinicopathological study of hepatocellular carcinoma with peliotic change. *Oncology Letters*, 2010, 1(1):17-21.

2) Ogasawara S, Komuta M, Nakashima O, Akiba J, Tsuneoka M, Yano H: Accelerated expression of a Myc target gene Mina53 in aggressive hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2010 (in press).

3) Futami K, Ogasawara S, Goto H, Yano H, Furuichi Y: RecQL1 DNA repair

helicase: A potential tumor marker and therapeutic target against hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med*, 2010 (in press).

2. 学会発表

1) Ogasawara S., Akiba J., Nakashima O., Futami K., Furuichi Y., Yano H. Expression of RecQL1 helicase in hepatocellular carcinoma. Annual Meeting of International Liver cancer Association. Milan, Italy, September, 2009.

2) Hisaka T., Horiuchi H., Uchida S.,

Ishikawa H., Fujishita N., Eto D., Kinoshita H., Shirouzu K., Akiba J., Ogasawara S., Yano H. Quercetin suppresses the proliferation of liver cancer cell lines in vitro. Annual Meeting of International Liver cancer Association. Milan, Italy, September, 2009.

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

2009 330 20 A (2/2)

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

データマイニング手法を用いた効果的な治療方法
に関する研究

平成21年度

総括研究報告書
分担研究報告書
(2/2)

論 文 集

研究代表者

八 橋 弘

平成 22(2010)年 3 月

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

データマイニング手法を用いた効果的な治療方法
に関する研究

平成21年度

総括研究報告書
分担研究報告書
(2/2)

論 文 集

研究代表者

八 橋 弘

平成 22(2010)年 3 月

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
八橋 弘, 石橋大海	IFN延長投与の基準, Peg-IFN/RBV併用療法の延長投与ではRBV総投与量/体重比3.0以上を目指す	犬山シンポジウム記録刊行会	第27回 犬山シンポジウム記録集 C型肝炎	株式会社メディカルレビューン	東京	2010	59-65
八橋 弘	序章 患者説明に役立つ図譜: 診断の流れ, 治療の概要, I章 C型肝炎の診療に当たって: 自然経過, III章 症例で学ぶ C型肝炎のIFN治療: 高齢者, V章 治療後の対応とその他のIFN治療	銭谷幹男・ 八橋 弘・ 柴田 実	そこが知りたい C型肝炎のベスト治療—インターフェロンを中心に	医学書院	東京	2009	8-9, 12-13, 84-85, 138-139

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
八橋 弘	特集/C型肝炎 難治例の治療をどう行うか—治療効果の向上を目指して—, C型肝炎治療の基本と実際, 抗ウイルス療法—その効果と進め方	消化器の臨床	12(1)	29-35	2009
八橋 弘	データマイニングを用いた治療効果予測	医学のあゆみ	229(1)	90-95	2009
八橋 弘	データマイニング解析と治療戦略	Medical Practice	27(1)	117-118	2010
Taura N, <u>Yatsuhashi H</u> , <u>Nakao K</u> , Ichikawa T, Ishibashi H.	Long-term trends of the incidence of hepatocellular carcinoma in the Nagasaki prefecture, Japan.	Oncol Rep.	21(1)	223-227	2009
Migita K, Sawakami-Kobayashi K, Maeda Y, <u>Nakao K</u> , Kondoh S, Sugiura M, Kawasumi R, Segawa O, Tajima H, Machida M, Nakamura M, Yano K, Abiru S, Kawasaki E, <u>Yatsuhashi H</u> , Eguchi K, Ishibashi H.	Interleukin-18 promoter polymorphisms and the disease progression of Hepatitis B virus-related liver disease.	Transl Res.	153(2)	91-96	2009
八橋 弘, 矢野公士, 長岡進矢, 阿比留正剛	特集/ここが知りたいウイルス性肝炎への抗ウイルス療法の問題点と将来展望, B型肝炎, 急性肝炎への核酸アナログ投与の適応と中止基準	肝胆膵	58(5)	601-608	2009
八橋 弘, 長岡進矢, 妻成寛, 阿比留正剛	特集/B型肝炎—病態解明と治療の最前線, B型肝炎の病態解明最前線, (1) HBV感染症の自然史	臨床消化器内科	24(6)	637-644	2009