

	品名, 規格単位	適応, 用法・用量	警告, 禁忌, 副作用等
肝機能改善薬(肝臓加水分解物)	肝臓加水分解物配合剤(liver hydrolysate combined)		
	<b>プロヘパール</b> (科研) ④(肝臓加水分解物, 塩酸システイン, 重酒石酸コリン, イノシトール, シアノコバラミン)≒7.6	慢性肝疾患における肝機能の改善 ≒ 1回1~2錠を1日3回	㊟ 肝性昏睡
肝機能改善薬(肝臓抽出製剤)	肝臓エキス・フラビンアデニンジヌクレオチド (liver extract・flavin adenine dinucleotide)		
	<b>アデラピン9号</b> (三和化学) ④[1mL中肝臓エキス15μL, フラビンアデニンジヌクレオチド10mg] 1mL≒169(㊟60~91), 2mL≒289(㊟79~106)	慢性肝疾患における肝機能の改善, 次の疾患(湿疹・皮膚炎群, 口唇炎・口角炎・口内炎, びまん性表層角膜炎)のうちビタミンB <sub>2</sub> の欠乏又は代謝障害が関与すると推定される場合, ビタミンB <sub>2</sub> の需要が増大し, 食事からの摂取が不十分な際の補給(消耗性疾患, 妊産婦, 授乳婦等) ≒ 1日1~2mLを1~2回に分けて皮下注, 筋注, 静注	㊟(重大) ショック
アレルギー用薬	グリチルリチン酸・DL-メチオニン配合剤(glycyrrhizic acid・DL-methionine combined)		
	<b>グリチロン</b> (ミノファージェン) ④(1錠中グリチルリチン酸25mg, グリシン25mg, DL-メチオニン25mg) ≒6.2 粉砕○	慢性肝疾患における肝機能異常の改善. 湿疹・皮膚炎, 小児ストロフルス, 円形脱毛症, 口内炎 ≒ 1回2~3錠(小児1錠)を1日3回食後	㊟ アルドステロン症, ミオパシー, 低K血症, 血清アンモニウム値上昇傾向にある末期肝硬変症 ㊟(重大) 偽アルドステロン症 (併注) ループ利尿薬, サイアザイド系・類似降圧利尿薬, 塩酸モキシフロキサシン
肝蛋白質代謝改善薬	マロチラート(malotilate)		
	<b>カンテック</b> (第一三共) ④200mg≒111.9 粉砕(⊖)	肝硬変(代償性)における肝機能の改善 ≒ 1日600mgを3回に分服	㊟ 黄疸, 腹水, 肝性脳症 ㊟(重大) 黄疸, 腹水, AST・ALT・Bilの高度上昇等の重篤な肝障害(その他(5%以上)) 食欲不振・嘔吐等の消化器症状, Bil上昇等の肝機能異常

28 肝疾患治療薬

㊟...後発品 ㊟...剤形が見出し製品と異なるものあり ㊟...適応が見出し製品と異なるものあり

520 肝疾患治療薬

品名, 規格単位	適応, 用法・用量	警告, 禁忌, 副作用等
	(半減期) (未変) 6.7時間, (活性) 8.4時間(200mg) (授乳婦) 授乳回避	
プロパゲルマニウム(propagermanium)		
免疫賦活薬	<b>セロシオン</b> (三和化学=アステラス) ④ 10mg ≒ 203.5 粉砕(○)	HBe抗原陽性B型慢性肝炎におけるウイルスマーカの改善 ⇒ 1日30mgを3回に分服, 食後, 開始16週目にウイルスマーカ(HBe抗原等)を含めた臨床検査を実施し, ウイルスマーカの改善がみられなかった場合には他の療法を考慮 (半減期) 2.4時間(15mg) (授乳婦) 授乳中止 (高齢者) 1日20mgから開始するなど慎重に投与
	薬情報 調剤・薬学 管理のPoint	B型慢性肝炎重症化の可能性を有するため, 黄疸, 肝硬変, 肝硬変疑いには投与しない
L-アルギニンL-グルタミン酸塩水和物(L-arginine L-glutamate hydrate)		
	<b>アルギメート</b> (味の素=味の素ファルマ) ④ 20g/200mL ≒ 625	高アンモニア血症 ⇒ 1日2~20gを1~数回に分けて点滴静注 (併注) 全身麻酔薬, イソニアジド, イオン交換樹脂, サイアザイド系利尿薬 (授乳婦) 授乳回避
L-グルタミン酸ナトリウム水和物(sodium L-glutamate hydrate)		
高アンモニア血症改善薬	<b>アンコーマ</b> (東亜薬工=鳥居) ④ [点滴静注] 4g/20mL ≒ 225	高アンモニア血症 ⇒ 4~8gを5%㉞に混合したものの約100mLを点滴静注
	<b>ポルトラック</b> (日本新薬) ④ 1g ≒ 7.5	非代償性肝硬変に伴う高アンモニア血症 1日量18~36gを3回に分けて, 用時水に溶解後経口投与, 下痢が引き起こされることがあるので初回投与量は1日量18gとして漸増, 便秘状態として1日2~3回程度の軟便がみられる量を投与 (1日最高) 36g, 水様便が現れた場合には減量又は一時中止 (併注) ガラクトース血症 (併注) αグルコシダーゼ阻害薬
	臨床情報 腎不全時: A, 透析時: A 調剤・薬学 管理のPoint	ガラクトース血症の患者には投与しない

品名,規格単位	適応,用法・用量	警告,禁忌,副作用等	
<b>ラクツロース(lactulose)</b>			
<b>モニラック</b> (中外) ① 1g≒7.7 ② 650mg/mL(65%) ≒6.4(④4.8)	① 高アンモニア血症に伴う精神神経障害・手指振戦・脳波異常の改善 ⇒ (モニラック ①) 1日19.5~39gを3回に分服。(ラクツロース) 1日18~36gを用時溶解し(②は1日本剤30~60mL), 2~3回に分服。(モニラック ②) 1日本剤30~60mLを3回に分服 ② (ラクツロース除く)産婦人科術後の排ガス・排便の促進 ⇒ ① 1日19.5~39gを2回に分服,朝夕 ② 1日本剤30~60mLを2回に分服,朝夕 ③ (ラクツロース,カロリール除く)小児における便秘の改善 ⇒ ① 1日0.33~1.3g/kgを3回に分服. ② 1日本剤0.5~2mL/kgを3回に分服	㊟ ガラクトース血症 ㊞ その他(5%以上) (モニラック,ラクツロース)下痢 併注 αグルコシダーゼ阻害薬	
			<b>ラクツロース</b> (興和=興和創薬) ① [P]1g≒10 ② 600mg/mL(60%) ≒6.6
			<b>カロリール</b> (佐藤製薬) ① ① (40.496%) 1g <sup>▽</sup> ≒4.1(④4.1)
(後発品) カロリール,ピアレ,ラグノス,リフォロース 臨床情報 ㊟ (モニラック,ラクツロース)腎不全時:A,透析時:A 調剤・薬学管理のPoint ガラクトース血症の患者には投与しない			
<b>肝不全用アミノ酸製剤(amino acid preparations for hepatic insufficiency)</b>			
<b>アミノレバン</b> (大塚工場=大塚製薬) ① [点滴静注]200mL ≒451(④365), 500mL≒925 (④753)	慢性肝障害時における脳症の改善 ⇒ (アミノレバン) 1回500~1000mLを点滴静注(投与速度) 500mL/180~300分 (経中心静脈輸液法) 500~1000mLを糖質輸液等に混和し,24時間かけて持続注入 (モリヘパミン) 1回500mLを点滴静注(投与速度) 500mL/180分以上(経中心静脈輸液法) 500mLを糖質輸液等に混和し,24時間かけて持続注入	㊟ 重篤な腎障害,アミノ酸代謝異常症 ㊞ (重大)(アミノレバンのみ) 低血糖,高アンモニア血症	
			<b>モリヘパミン</b> (味の素=味の素ファルマ) ① [点滴静注]200mL ≒469(④365), 300mL≒675, 500mL≒982(④753)
(他製品) テルフィス,ヒカリレバン 臨床情報 調剤・薬学管理のPoint 重篤な腎障害のある患者には投与しない,定期的な電解質,腎機能等のモニタリングが必要			
<b>乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン</b>			
	<b>エイムゲン</b>	予防接種用薬⇒1254頁参照	

高アンモニア血症改善薬

肝性脳症改善薬

28

肝疾患治療薬

▽...後発品 ④...剤形が見出し製品と異なるものあり ㊟...適応が見出し製品と異なるものあり

	品名, 規格単位	適応, 用法・用量	警告, 禁忌, 副作用等
肝炎ワクチン	組換え沈降B型肝炎ワクチン		
	ビームゲン	予防接種用薬E・1254頁参照	
	ヘプタバックス-Ⅱ		
	沈降B型肝炎ワクチン		
	小柴胡湯		
	小柴胡湯	漢方薬E・1334頁参照	

夫蘇歐共  
製薬学大研心

夫5補西土  
製薬学大研心

胆太勤理普  
製薬学大研心



不のいハ原巻

- 1 M. pylori 菌の感染予防薬
- 2 呼吸器感染症の予防薬
- 3 home 薬とが原因の COVID-19
- 4 COVID-19 の重症化を抑制する薬
- 5 エボラウイルス感染症の予防薬
- 6 感染症の予防薬
- 7 感染症の予防薬
- 8 COVID-19 の重症化を抑制する薬
- 9 感染症の予防薬

# 消化器疾患 最新の治療

[編集]

菅野健太郎  
自治医科大学教授

上西紀夫  
公立昭和病院院長

井廻道夫  
昭和大学教授

## 巻頭トピックス

1. *H.pylori* 除菌治療の現状と展望
2. カプセル内視鏡の最新情報
3. Rome III 基準とわが国のFGID
4. ESDの適応拡大の現状と問題点
5. エビデンスに基づいた進行胃癌の手術
6. 肥満に対する内視鏡的および外科的治療
7. 肝癌に対する免疫療法
8. C型肝炎ウイルス変異と治療反応性
9. 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法

南江堂

# 4 B型慢性肝炎

鈴木文孝, 熊田博光

## I 疾患の解説

わが国におけるB型肝炎ウイルス(HBV)感染者はかつて人口の3%, 300万人が存在するといわれていたが, 近年母子感染事業による感染防御の実施や衛生環境の改善などによりHBVキャリアは減少傾向にある。実際, 青年層でのキャリア率は低下し中高年でのキャリア率も1~2%と考えられている。わが国のHBVキャリアの多くは生後3年以内の免疫能の未熟な時期に感染したものであるが, その多くは出産時HBVキャリアの母親から感染することが多かった。現在は母親がHBVキャリアである場合は,  $\gamma$ グロブリンとワクチン接種が行われており20歳以下のキャリア数は減少している。一方HBVのgenotype Aの感染例では成人でも慢性化する可能性があり, 現在感染症例の増加が懸念されている。

HBVキャリアの自然経過は, 若年時HBe抗原陽性でウイルス量が多いにもかかわらずALT値正常の時期(HBe抗原陽性の無症候性キャリア)から始まる。その後, 宿主の免疫応答によってHBe抗体へとseroconversionを認め, 最終的にはALT値正常, ウイルス量の低下したHBe抗体陽性の無症候性キャリアになると考えられている。seroconversionの時期は10~30歳代に認められることが多く, 女性のほうがより早い。seroconversionが起こる時期には多くの症例で一時的な肝炎の発症が認められる。しかし一部の症例では肝炎が持続し, 慢性肝炎, 肝硬変症へと進行する症例も認められる。またHBVキャリアの場合, 無症候性キャリアとなっても肝癌発症の可能性はあり, 定期的な経過観察は必要である。

## II 診断と検査

HBVキャリアの病態を把握するうえで, HBV

DNA量, HBe抗原の測定, 肝機能検査は定期的に必要である。また初回検査時にはHBV genotypeを一度測定しておくことが望ましい(しかし現在保険適用が認められていない)。治療の目標は, HBe抗原の陰性化, ALT値の持続的正常化, HBV DNA量が5 log copies/mL以下を持続することである。最終的には, HBs抗原の陰性化が得られるとその後の肝炎の再燃はほとんど認められなくなり, 発癌のリスクもかなり低下する。しかしわが国においてはHBVキャリアからのHBs抗原の陰性化はまれな現象である。

## III 治療の一般方針

### ① 治療方針の立て方

B型慢性肝炎の治療に対しては, 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)における「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的研究」の研究班においてB型慢性肝炎治療のガイドラインを作成している<sup>1)</sup>。このガイドラインでは, 年齢, HBe抗原の有無, ウイルス量によって分類し治療法を提示している(表1, 2)。若年症例(35歳未満)は自己の免疫力によってHBe抗原の陰性化や肝炎の収束が期待されるため, 核酸アナログ製剤の長期投与ではなくIFN長期間欠投与を基本治療としている。中高年では, 核酸アナログ製剤の長期投与を基本治療としている。

### ② 薬物療法

#### a. インターフェロン(IFN)療法

わが国では, IFN療法はHBe抗原の慢性肝炎に対して6ヵ月間投与の保険治療が認められている。わが国でのIFN療法の治療成績は約20%が治療6ヵ月後の時点で著効となると報告され

表1 35歳未満B型慢性肝炎の治療ガイドライン

HBV DNA 量 HBe 抗原	≥ 7 log copies/mL	< 7 log copies/mL
e 抗原陽性	①IFN 長期投与(3 ヶ月以上) ②エンテカビル	IFN 長期投与(3 ヶ月以上)
e 抗原陰性	①経過観察 ②IFN 長期投与(3 ヶ月以上)あるいはエンテカビル	経過観察(F2以上の進行例にはIFN, エンテカビル)

治療対象は、ALT ≥ 31 IU/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 (文献1より引用)

表2 35歳以上B型慢性肝炎の治療ガイドライン

HBV DNA 量 HBe 抗原	≥ 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+IFN 連続投与(3 ヶ月以上)	①エンテカビル ②IFN 長期投与(3 ヶ月以上)
e 抗原陰性	エンテカビル	エンテカビル

治療対象は、ALT ≥ 31 IU/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 (文献1より引用)

ている<sup>2)</sup>。著効になる症例は年齢が35歳未満、治療開始時ALT値が高い例であった。このことから、ガイドラインにおいても35歳未満のHBe抗原陽性症例では、IFN療法が推奨されている。

○ 処方例 ○ .....

①スミフェロン 1日1回300万~600万単位、皮下または筋肉注射、2~4週間連日その後週3回合計24週間投与

②イントロンA 1週目1日1回600万~1,000万単位、2週目より1日1回600万、筋肉注射。ただし投与開始日は300万~600万単位を投与する

投与方法は①と同じ

③オーアイエフ 1日1回250万~500万単位、筋肉注射  
投与方法は①と同じ

④フェロン 初日300万単位、点滴静注または静注、以後6日間1日1~2回、2週以降1日1回、点滴静注または静注

b. 核酸アナログ製剤(ラミブジン, アデフォビル, エンテカビル)

核酸アナログ製剤であるラミブジンは、逆転写酵素阻害作用を有しウイルスのDNAポリメラーゼに選択的に作用する。ラミブジンは成人で腎機能が正常の症例には1日100mg(ゼフィックス1錠)を経口投与する。ラミブジンには副作用がほとんど認められず、また強力なウイルス増殖抑制作用があり2000年の保険適用以来多くの症例で使用されてきた。しかしラミブジンは投与中止により多くの症例で肝炎の再燃を認めることと、長期投与によって耐性ウイルスが高率に出現するという問題点がある。このため現在ではより耐性ウイルスの出現率が低いエンテカビル(バラクルード)の使用が奨励されている。

○ 処方例 ○ .....

①ゼフィックス(100mg) 1錠/日(分1) 経口投与。原則的に長期投与を行う

ラミブジン耐性ウイルス出現例の対処としては、アデフォビルまたはエンテカビルの使用が可能である。この場合アデフォビルの使用が奨励さ

表3 ラミブジン投与中B型慢性肝炎患者に対する核酸アナログ製剤治療ガイドライン

ラミブジン投与期間		3年未満	3年以上
HBV DNA量			
<2.6 log copies/mL 持続		エンテカビル 0.5 mg/日に切り替え可	
≥2.6 log copies/mL	BTH* なし	エンテカビル**0.5 mg/日に切り替え可	ラミブジン 100 mg/日を継続
	BTH* あり	アデフォビル 10 mg/日併用	アデフォビル 10 mg/日併用

\* BTH : breakthrough hepatitis

(文献1より引用)

\*\* ラミブジン変異のないことを確認後投与

れている。アデフォビルはエンテカビルと比較して、HBV DNAの減少率で上回り、またラミブジンとの併用で両剤への耐性ウイルスの出現率が低率であることが報告されている。一方エンテカビルの場合は、ラミブジン耐性ウイルスが存在する症例ではエンテカビル耐性ウイルスの出現の可能性があるのでその使用には慎重でなくてはならない。

○ 処方例 ○ .....

- ①ヘプセラ(10 mg) 1錠/日(分1), 経口投与。ラミブジン耐性ウイルス出現時にラミブジン 100 mg と併用投与する

エンテカビルは2006年9月に保険適用となった新たな核酸アナログ製剤である。エンテカビルは、ラミブジンと比較してHBV DNAの減少率で有意に上回っていること、また核酸アナログ未使用症例(naive症例)においては耐性ウイルスの出現率が低率であることが報告されている。このことからガイドラインではnaive症例における第一選択薬となっている。一方前述したようにラミブジン耐性ウイルスが出現した症例では、エンテカビル投与によってエンテカビル耐性ウイルスの出現の可能性があり、エンテカビルの使用は慎重でなくてはならない。

○ 処方例 ○ .....

- ①バラクルード(0.5 mg) 1錠/日(分1)  
(内服前後で2時間は食事摂取を避ける必要がある。このため眠前に投与することが多い), 経口投与  
②バラクルード(1.0 mg) 1錠/日(分1),

経口投与。ラミブジン耐性ウイルス出現例では1.0 mg投与が可能である。この場合ラミブジンから切り替える必要がある。

エンテカビルの登場によって核酸アナログ製剤の使用法も変化してきている。もともとラミブジンを使用していた症例での核酸アナログ製剤使用の方法についてもガイドラインは提示している(表3)。HBV DNA量が2.6 log copies/mL以上でbreakthrough hepatitis(BTH)を認めた症例はラミブジンとアデフォビル併用、BTHを認めていない3年未満の症例ではできればラミブジン耐性ウイルスの有無を確認し耐性ウイルスが認められなければエンテカビルに切り替え可能、3年以上経過している症例では耐性ウイルスが認められる可能性が高いことからラミブジンを継続しBTH出現時にはアデフォビルを併用することとしている。HBV DNA量が2.6 log copies/mL未満の症例のうち、投与期間が3年未満ではラミブジン耐性ウイルスの存在する可能性が低いためエンテカビルに切り替え可能であるが、3年以上投与例では耐性ウイルスが存在している可能性が高くなるためラミブジン継続としている。

### ③ その他

ガイドラインの補足として、治療の対象や治療に対する基本的な考え方が提示されている(表4)。B型慢性肝炎の経過は個々の症例で違いがあり、年齢、ウイルスマーカー、肝組織所見、家族歴などを考慮し総合的に決定する必要がある。

表 4 B 型慢性肝炎の治療(ガイドラインの補足)

1. 抗ウイルス療法は、ALT 値が ALT $\geq$ 31 IU/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(SNMC, UDCA など)で経過をみることも可能である。
2. 若年(35 歳未満)症例では、インターフェロン(IFN)長期投与(3 ヶ月以上)あるいはエンテカビル投与が原則。なお、ステロイド、IFN、核酸アナログの短期併用療法も考慮すること。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 follow-up することもある。(IFN 在宅自己注射可能な症例は QOL を考慮し在宅自己注射を推奨する)
3. 中年(35 歳以上)症例では、核酸アナログ未使用例は、エンテカビルが第一選択になる。
4. 母子感染例は IFN 抵抗性のことが多く、エンテカビル単独あるいはエンテカビル+IFN 連続療法も適応になる。
5. ラミブジン耐性ウイルスによる肝炎に対しては、アデフォビルが第一選択になる。組織学的進行例では HBV DNA 量が上昇した時点でアデフォビルを開始する。
6. 肝硬変例および肝細胞癌治療後の症例も、核酸アナログの治療を行う。

注意

1. HIV を合併している症例では、エンテカビルの使用により HIV 耐性ウイルスが出現する可能性があるためエンテカビルは使用できない。
2. HBV DNA 量が低値で ALT 値が正常の例であっても免疫抑制作用のある薬剤や抗がん剤投与時には HBV DNA 量が上昇して高度の肝障害をきたすことがあるため注意が必要である(免疫抑制・化学療法により発症する B 型肝炎に対する診療ガイドライン参照)。(文献 1 より引用)

文 献

- 1) 熊田博光：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)、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、平成 19 年度総括・分担研究報告書、平成 20 年 3 月
- 2) Suzuki F et al: Efficacy of 6-month interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection in Japan. J Gastroenterol 39 : 969-974, 2004

## 生体膜脂質のC型肝炎ウイルス生活環における役割

相崎英樹

国立感染症研究所 ウイルス第二部 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1

### Critical Role of Membrane-associated Lipid in the Life Cycle of the Hepatitis C Virus

Hideki Aizaki

Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases  
1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Systems of subgenomic replicon and recombinant infectious hepatitis C virus (HCV) have been established in 1999 and 2005, and virological techniques are able to be applied to the HCV research, especially regarding molecular mechanisms on replication and virion assembly, respectively. We showed that HCV active replication complex contains membrane structures, characteristic of lipid rafts. We also recently demonstrated an important role of cholesterol and sphingolipid in HCV infection and virion maturation. Finally, inhibitors of cellular cholesterol and sphingolipid biosynthetic pathway efficiently block virion production. Association of hepatitis C virus with lipid can be also a source of new antiviral therapies.

Key words : hepatitis C virus / life cycle / subgenomic replicon / cholesterol / sphingolipid

#### 1. はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者は日本で約200万人、世界中で1億7000万人にのぼる<sup>1)</sup>とされ、その多くが10~30年という長期間を経て慢性肝炎から肝硬変へと進行し、高率に肝細胞癌を発症している<sup>2)</sup>。現在、HCV感染症に対する主要な治療法はインターフェロン (IFN) とリバビリンによる併用療法であるが、有効となるのは半数の患者にすぎない。より有効な治療法の開発が望まれているが、HCVには効率の良いウイルス培養系が存在しなかったため、HCVの基礎研究はウイルス遺伝子の発現産物の機能解析を中心に進んだ。また、実験用の感染小動物が存在しないため、HCVのウイルス学的な解析はチンパンジーを用いた感染実験に頼るしか無く、倫理的な問

題やコストの面からも安易にできる実験ではなかった。このような状況がHCVの基礎研究の妨げになり、抗ウイルス薬やワクチンの開発が遅れてきた。しかし、1999年に培養細胞で自律複製する構造領域を欠くサブゲノムレプリコンが開発され<sup>3)</sup>、これを皮切りにHCVの複製に関する研究が精力的に進められてきた。さらに、劇症肝炎患者から単離されたJFH-1株のゲノムRNAを肝癌細胞由来のHuh-7細胞に導入することにより、感染性ウイルス粒子を培養細胞で作製する技術が2005年に確立された<sup>4)</sup>。これにより、HCVの生活環のすべてを再現可能な実験系が確立したことになり、HCV研究を急速に加速させた。

#### 2. HCVの生活環

推定されているHCVの生活環をFig. 1に示す。HCVがレセプターを介して肝細胞に感染 (吸着 Attachment, 侵入 Entry) し、粒子よりウイルスRNAが放出され (脱核 Cytoplasmic release), これがメッ

Tel : 03-5285-1111 ex. 2521

Fax : 03-5285-1161

E-mail : aizaki@nih.go.jp

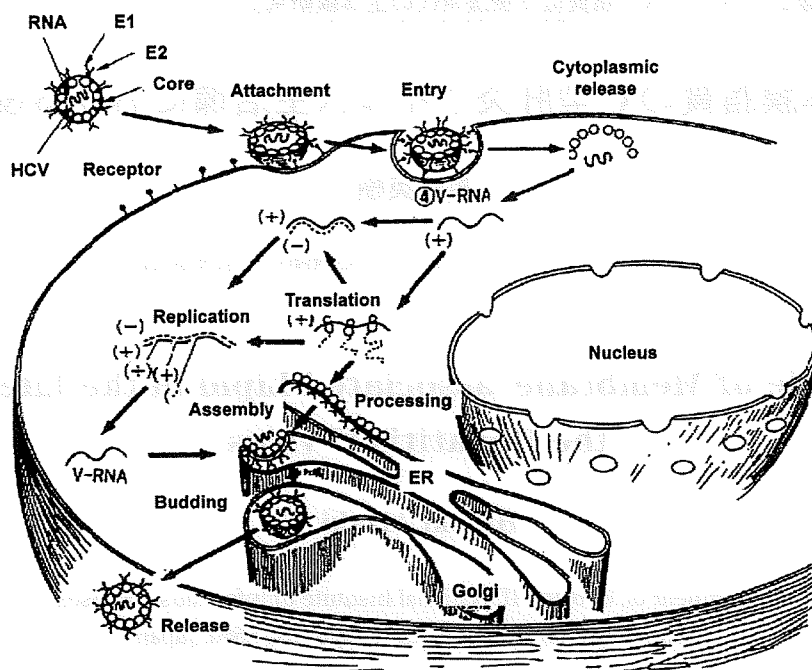


Fig. 1 HCV life cycle<sup>18)</sup>.

センジャーRNAとして働き、このRNAの5'非翻訳領域に存在するIRESから翻訳(Translation)が開始され大きな前駆体蛋白が合成される。この前駆体蛋白は、細胞のシグナラーゼによってウイルス粒子を形成する構造蛋白であるコア蛋白と2つのエンベロープ蛋白E1, E2がプロセス(Processing)される。また、ウイルス自身がコードするプロテアーゼによって、プロテアーゼ、ヘリカーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)などウイルスの複製に必須な非構造蛋白がプロセスされる。ウイルスにコードされた酵素や宿主因子によってゲノムRNAからマイナス鎖RNAが転写され、複製複合体が形成される。これを基にしてプラス鎖RNAが合成され(複製Replication)、ウイルスRNAやmRNAとして働く。ウイルスRNAがコア蛋白と結合してヌクレオカプシドを形成し、さらにエンベロープ蛋白が邂逅して小胞体(ER)でウイルス粒子が成熟し(出芽Assembly)、トランスゴルジを通り細胞膜に達して細胞外へ放出(Release)されるものと考えられている。以上のようなHCV生活環のうち多くのステップでウイルスは細胞のER、ゴルジ体、形質膜といった生体膜を使っていると推定されている。

### 3. 生体膜脂質のウイルスゲノム複製における役割

ウイルスゲノム複製においてNS5B遺伝子のコード

するRdRpが中心的な役割を担っているものと考えられている。しかしながら、強制発現させたRdRpを精製し解析したところ、その活性は鋳型特異性がなく、複製産物の長さは鋳型と異なった。一般的に、鋳型特異的なRNA合成には細胞因子や他のNS蛋白が必要と考えられている<sup>9)</sup>。以上のことから、HCV複製の研究にはNS5Bだけでなく、他のNS蛋白や宿主因子が結合した複製複合体を維持した上での解析が重要ということが考えられる。従って、HCVレプリコンシステムはHCVゲノムの複製機構を解析する上で非常に有効と期待された。1999年、Bartenschlagerらは、本来HCVゲノムの中でウイルス粒子を形成する構造タンパク質領域を薬剤耐性遺伝子に置き換え、その下流に、より強力にHCVゲノムの内部から翻訳させる働きを有するencepharomyocarditis virus(EMCV)のIRESを挿入したRNAレプリコンを作製した<sup>9)</sup>。このRNAをトランスフェクトした細胞を薬剤存在下で培養することで、自律複製するHCV遺伝子配列を獲得したHCVゲノムと、更にこのHCV遺伝子が複製しうる細胞を選択することを目指した。そして、このようなHCVのRNAレプリコンの複製を許容できる細胞がトランスフェクトしたヒト肝細胞癌由来Huh7細胞の一部から得られ、これによりHCVで初めてタンパク質レベルでウイルスの複製・増殖を解析できる系が確立された。

筆者らはこのレプリコン細胞内で複製しているHCV遺伝子を観察したいと考え、レプリコン細胞を

用いて、アクチノマイシンD処理して細胞内のDNA依存性RNAポリメラーゼを抑えた上で、5-bromouridine 5'-triphosphate (BrUTP)を細胞に導入し、免疫組織染色で観察した<sup>6)</sup>。BrUTPが取り込まれた新規に合成されたHCV RNAはレプリコン細胞の核周辺の細胞質に斑点状の構造物として認められ、これらはNSタンパク質と共局在した。レプリコン細胞を電子顕微鏡で観察すると「membranous web」と呼ばれる小胞様構造物が認められることが報告されており<sup>7)</sup>、HCVの全ての構造、非構造蛋白を強制発現させても同様の膜変化が生じることが知られている。このような変化は、HCVが感染したチンパンジーの肝細胞の電顕観察でスポンジ状の形態変化として報告されている<sup>8)</sup>。以上のことから、HCVの複製複合体は感染細胞のmembranous webに存在しているものと思われる。

次に、生化学的手法を用いて、複製活性を維持したままのHCV複製複合体を粗精製し解析することを目指した<sup>9)</sup>。細胞を低浸透圧液に溶解し、ホモジナイズを行った後、核画分を除き、ショ糖密度勾配法で膜とその他の細胞質成分に分画した。それぞれの画分について、多糖体でできたダイアフロ-限外濾過膜を用いて限外濾過を行い、低分子量のタンパク質は除去した。HCV RNAとNSタンパク質は膜画分に検出された。lysateをNonidet P-40 (NP-40)やTriton X-100 (TX-100)などの非イオン性界面活性剤で処理した後、同様に分画したところ、HCV RNAとNSタンパク質の大部分は界面活性剤不溶性画分(DRM)に残った。それぞれの画分に標識化合物(CTP)を加え、この取り込みを指標にしたHCV RNA複製活性測定を行ったところ、活性はDRMにのみ検出された。以上のことから、このDRMに複製活性を保持したHCV複製複合体が存在することが判明した。界面活性剤可溶性画分(DSM)にもNSタンパク質は認められたが、限外濾過を行ったところ、検出されなくなったことから、このNSタンパク質はHCV複製複合体を形成していないと考えられた。以上のように、HCV複製複合体がDRMに検出されたことから、HCV複製複合体が脂質ラフトと結合している可能性が示唆された。そこでこのことを確かめるために、脂質ラフトの構成成分であるコレステロールを除去する働きのあるサポニン(pore-forming agent)で処理したところ、NSタンパク質は脂質ラフトのマーカであるカベオリン2と共にDRMからDSMへと移行した。更に、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤のロバスタチンでレプリコン細胞内のコレステロール合成を抑制するとHCV RNA複製効率も落ちることから、脂質ラフトがHCV複製複合体と結合し、

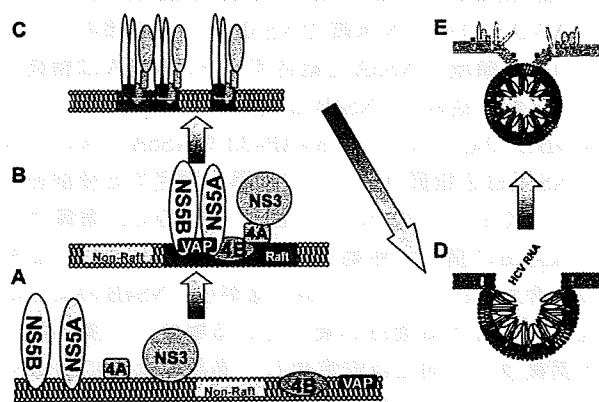


Fig. 2 Model of HCV replication<sup>9)</sup>.

HCV複製において重要な役割を果たしている可能性が示唆された<sup>9)</sup>。また、NS蛋白が脂質ラフトに結合するのを抑制することで、各種スフィンゴ脂質合成阻害剤がウイルス複製を抑えるという報告があり、脂質ラフトの存在する膜上で複製が起こるといふ仮説が支持された<sup>10)</sup>。

以上のように、HCVは細胞の生体膜上の小胞内で複製複合体を形成し、複製するものと考えられている。脂質ラフトは細胞膜上にスフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ微小領域を示す。この脂質ラフトは、膜表面上をイカダのように漂いながら、ラフト同士が結合して島状のものになったり、小胞を形成したりと、ダイナミックに変化しながら、ラフトに結合するタンパク質の濃縮や細胞内輸送、シグナルトランスダクション、脂質代謝を担っていると考えられる<sup>11)</sup>。また、脂質ラフトはインフルエンザウイルスの集合・出芽、ヒト免疫不全ウイルスの集合・出芽や侵入、エボラウイルスの集合、コクサッキーウイルスA9の侵入、HTLV-1の膜融合や集合、マウス白血病ウイルスの侵入、麻疹ウイルスの集合、センダイウイルスの集合、RSウイルスの集合、マーブルグウイルス、ロタウイルスの集合、ヒト単純ヘルペスウイルスの集合や侵入、エコーウイルス11の侵入、などの多くのウイルスの侵入や粒子形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。しかしながら、ウイルスゲノム複製に影響を与えることはHCV研究で初めて示された<sup>9)</sup>。

Fig. 2にHCV複製複合体形成モデルを示す。HCVNS蛋白はERで合成され、NS4Bは膜に、NS5Aはその5末端で、NS5Bはその3末端で膜にアンカーしている(A)。HCVNS蛋白はゴルジ体に輸送され、HCVNS蛋白同士で結合する。また、細胞内膜タンパク質の一つで、細胞内膜輸送に関わっていると考えられているthe human homologue of the 33-kDa ves-

cle-associated membrane protein-associated protein (VAP-A) はそのN末端でNS5Bと、中央部のコイルドコイル領域でNS5Aと結合する<sup>12)</sup>。NS5Aは脂質ラフトと弱く結合し、NS4Bは強く結合する。以上から、NS4Bが中心となって、hVAP-33やNS5Aと共に、他のNS蛋白を脂質ラフト上に誘導・固定する役割を担っているものと思われる(B)。一般的に、脂質ラフトは自由に膜上を移動し、集散を繰り返しているものと考えられている。しかしながら、NS4Bのように互いに結合する蛋白が乗っている場合、一度結合した脂質ラフト同士は安定化し、島状に次第に大きくなり、その過程で特定の蛋白を集積させる性格がある(C)。さらに、膜上の蛋白同士が結合するエネルギーにより、膜は小胞を形成するようになる(D)。既に、NS4B蛋白単独でもこの小胞構造を取ることが報告されている。ここにHCV RNAが取り込まれることにより、複製複合体を作り、複製が始まるものと考えられる(E)。以上のように、脂質ラフトはNS蛋白を集積させ、複合体を形成させるだけでなく、小胞構造をとり、膜に包まれたHCV複製の場を提供する役割があるものと想定されている。

筆者らはレプリコン細胞株からHCV複製複合体を含む画分を上記の方法で複製活性を維持したまま抽出しその構造を解析した<sup>9)</sup>。鎖特異的PCRを用い、複製複合体中のプラス、マイナス鎖RNAのコピー数について調べたところ、マイナス鎖RNA 1に対してプラス鎖RNA 10であった。分画を1% NP-40、4℃で処理後、RNA分解酵素やプロテアーゼで処理してもHCV RNAやNSタンパク質は分解されなかったが、脂質ラフトが破壊されるような強い条件(1% TX-100、37℃)で処理したところ、HCV RNAやNSタンパク質はRNA分解酵素やプロテアーゼ感受性に変化した。このことから、HCV複製複合体は脂質ラフトを含む膜小胞構造内に存在し、内部に存在するHCV RNAやNSタンパク質は外部からのRNA分解酵素やプロテアーゼに対して保護されているものと考えられた。最近の知見では、HCV複製複合体は膜小胞構造内に保護されており、外部から投与したHCV RNAは複製複合体に到達できず、既に内部に取り込まれているHCV RNAがテンプレートとなってマイナス鎖RNAが合成され、それをもとに複数のプラス鎖RNAが合成される。複製に必要なNSタンパク質は継続的に供給される必要はなく、一度HCV複製複合体を形成し、RNA複製が開始されると継続的にRNAが産生されるものと推定できる。膜小胞内にはHCVゲノムの量に対してNSタンパク質の量は1000倍以上と大量に存在しているものの、実際複製に関わっているのはほんのわずかに過ぎず、NSタンパク質の大部分

は膜小胞形成の役割を果たしているものと思われる。筆者らはスタチンの一つであるロバスタチンがHCV複製を阻害することを示したが、スタチンがゲラニルゲラニル化を抑制してウイルス複製を抑える可能性も指摘されている<sup>13)</sup>。

#### 4. 生体膜脂質のHCV粒子形成における役割

エンベロープウイルスは小胞体、ゴルジ体、形質膜などの細胞の生体膜を被って出芽するため、細胞の膜脂質はウイルス粒子形成に重要な役割を果たしているものと考えられる。さらに、ウイルス粒子の膜脂質が宿主細胞への感染過程に関与する例も報告されている。しかし、HCV粒子に含まれる脂質成分については解析が進んでおらず、その生理学的役割も不明であった。そこで筆者らは、培養細胞で産生させたHCV JFH-1粒子を、培養上清から、限外濾過、ショ糖密度勾配超遠心、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィを組み合わせて、濃縮、粗精製し、このHCV粒子に含まれる脂質を生化学的に解析した。その結果、コレステロール/リン脂質モル比が細胞の膜分画に比べて有意に高値を示したことから、コレステロールに富んだ生体膜からの出芽、または粒子形成、分泌過程でのコレステロールとの会合の可能性が考えられた<sup>4)</sup>。次にこのHCV粒子上の膜脂質がどのような役割を果たしているかを調べるため、HCV粒子表面をmethyl- $\beta$ -cyclodextrin (B-CD)で処理してコレステロールを除去した後感染させたところ、B-CDの用量依存的に感染性が低下し、B-CD処理した粒子にコレステロールを添加したところその感染性は回復した<sup>4)</sup>。また、コレステロールと親和性が高いスフィンゴ脂質の主要分子スフィンゴミエリンを加水分解するsphingomyelinase (SMase)でHCV粒子を処理することにより感染性の低下を観察した。これらのことはHCV genotype 1bのエンベロープを持つシュードタイプウイルスやキメラウイルスでも確認できた。以上から、ウイルス粒子表面のコレステロールとスフィンゴ脂質はウイルスの遺伝子型によらず感染に重要な役割を果たしていることが示された。次に、HCV粒子上のコレステロールが粒子の物性に与える影響を調べた。HCV産生細胞の培養上清をショ糖密度勾配遠心分画するとCore蛋白及びHCV RNAのピークは1.17 g/ml分画、感染性のピークは1.13 g/ml分画となる。このように、感染性のピークがウイルス遺伝子のそれに比べ低密度側に存在することは培養細胞系で作製したHCVの特徴の一つであるが、濃縮したこの培養上清をB-CD処理しコレステロール除去後に同様に遠心分画を行うと、

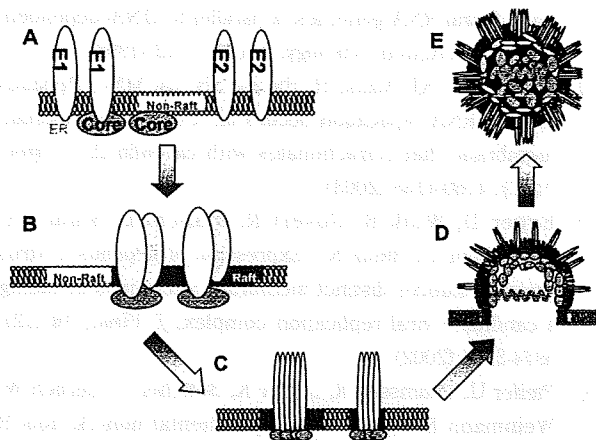


Fig. 3 Model of HCV assembly <sup>14)</sup>.

Core 蛋白のピークは 1.20 g/ml 分画に移行し、感染性はいずれの分画も検出限界以下であった。さらに、B-CD 処理後の培養上清にコレステロールを添加すると Core 蛋白のピークは低密度側へシフトし感染性も回復した。このようなコレステロールの除去、および、その後の添加による loss- and gain-of-function は 5 mg/ml B-CD 処理で観察されるが、B-CD 濃度を 10 mg/ml へ上げた場合はコレステロール添加によって感染性の回復は見られない。これらのことから、HCV 粒子表面のコレステロールは粒子構造の維持に役立っており、コレステロールを完全に除去してしまうと粒子構造は致命的なダメージを受ける、これに対し、部分的に除去した場合の構造変化は感染性を低下させるものの、その変化は再生可能なレベルである、と考えられた。次に、HCV 粒子上のコレステロールまたスフィンゴ脂質が感染過程のどのステップに関与するのかを解析した。あらかじめコレステロール除去または SMase 処理を行った HCV 粒子の宿主細胞への吸着性は未処理ウイルスと同等であったのに対し、吸着後の細胞内への取り込みは、これらの前処理を施した HCV で顕著な低下が認められた。レセプター蛋白分子とともに標的細胞内へウイルスが侵入する過程に粒子コレステロール、スフィンゴ脂質が関与する可能性が示された。

前述のように、HCV ゲノムは脂質ラフトの特徴である界面活性剤不溶性の膜分画で複製することが示され <sup>6, 9)</sup>、HCV genotype 1 のゲノム複製細胞また HCV が増殖するヒト肝細胞キメラマウスに脂質ラフト構成成分であるスフィンゴミエリンの合成阻害剤 myriocin/ISP-1 を添加、投与することによって、HCV 複製効率は顕著に低下することが報告されている <sup>10, 15)</sup>。この myriocin/ISP-1 またはセラミド輸送阻害剤 HPA-12 を HCV N 株 (genotype 1b) また JFH-1

株のサブゲノムレプリコン細胞に加えることによって、N 株では HCV ゲノム複製は阻害されるものの、JFH-1 株では予想に反して複製の低下はほとんど認められなかった。しかしながら、興味深いことに、JFH-1 のウイルス産生系では両薬剤の用量依存的に HCV 産生は抑制された <sup>14)</sup>。スフィンゴ脂質合成阻害剤の抗 HCV 効果の作用機序として HCV ゲノム複製阻害だけでなく粒子形成あるいは感染過程へも介入しうることが示唆された。

Fig. 3 に脂質ラフトを利用した HCV 粒子形成モデルを示す。HCV 構造蛋白は ER で合成され、E1 および E2 蛋白はその 3 末端で膜にアンカーしている (A)。HCV 構造蛋白はそれぞれ生体膜のうち脂質ラフトと結合する。さらに、コア蛋白と E1 蛋白、E1 と E2 蛋白はそれぞれ結合する (B)。一度結合した脂質ラフト同士はコア蛋白同士の結合する力で安定化し、島状に次第に大きくなり、その過程でウイルス粒子構成の蛋白を集積させる (C)。さらに、膜上のコア蛋白同士が結合するエネルギーにより、膜は小胞を形成するようになる (D)。ここにコア蛋白と結合する HCV RNA が取り込まれることにより、HCV 粒子を形成すると考えられる (E)。ウイルス粒子のコレステロールやスフィンゴ脂質を除くと感染性がなくなり、そこにコレステロールを加えると感染性が復活することから、ウイルス粒子膜上の脂質ラフトはウイルス粒子の感染性にも重要な役割を果たしているものと思われる。最近、HCV 粒子形成に細胞内脂肪滴が重要な役割を果たすという発見がなされた <sup>16)</sup>。脂肪滴に近接した生体膜で HCV 粒子が形成されている可能性が考えられている。

## 5. おわりに

日本膜学会第 31 年会の生体膜関連シンポジウムのタイトルは「脂質低下療法時代の生体膜研究」ということであつたので、最後に脂質低下療法による HCV 治療の可能性について考察してみたい。これまでの研究から、(i) ウイルス粒子膜は脂質に富んでおり感染に重要 <sup>14)</sup>、(ii) 細胞の形質膜の脂質も感染に重要 <sup>4)</sup>、(iii) 細胞の生体膜脂質はウイルスゲノム複製に重要 <sup>4)</sup>、(iv) 脂肪滴周辺の膜構造が粒子形成に重要 <sup>16)</sup>、など HCV はその生活環の多くのステップに脂質を必要としていることがわかってきた。そこで、筆者らはスタチン製剤でウイルス増殖を抑えることが可能かどうか調べた。ロバスタチンを HCV 持続感染細胞に投与したところウイルス粒子産生量が強く抑制された。スタチン製剤は既に臨床の現場で広く使われており、安全性が確立している薬剤であり、

既にC型肝炎患者の治療も試みられている。スタチン製剤単独療法ではHCV治療に有効と無効の報告があり、意見が割れるところであるが、IFNとの併用の場合にはHCV治療に有効<sup>17)</sup>という報告がある。

HCVはゲノム配列が多様で、大変変異しやすいウイルスである。そのエンベロープのアミノ酸配列を変えて宿主の免疫系から逃れ慢性持続感染を起こしていると考えられているだけでなく、IFNやリバビリンといった薬剤に対しても耐性を持つウイルスが出現しやすいことが知られている。新たな抗HCV薬として、ウイルスポテアーゼやポリメラーゼといったウイルス複製に関与する酵素を標的とした薬剤の開発研究が盛んに行われているが、HIVと同様にこれらの薬剤についてもHCVは耐性変異を獲得することが報告されている。上記で報告した宿主のコレステロール産生系やスフィンゴ脂質の産生系をターゲットとし、感染した細胞側の働きを抑えてウイルス増殖を抑制する抗HCV薬の開発は耐性ウイルスが出現しにくい薬剤につながる期待がある。

#### 謝 辞

本研究は下記の多くの研究者のご協力を得て遂行できたものであり、ここに謝意を表す：松浦善治（大阪大学微生物病研究所・分子ウイルス分野）、深澤征義、花田賢太郎（国立感染症研究所・細胞化学部）、西島正弘（国立医薬品食品衛生研究所）、マイケル・ライ（南加大・微生物学免疫学研究室）、脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男（国立感染症研究所・ウイルス第二部）

#### 文 献

- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM : Complete replication of hepatitis C virus in cell culture, *Science*, **309**, 623-626 (2005)
- Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koi S, Onji M, Ohta et al. Y : Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87** (17), 6547-6549 (1990)
- Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line, *Science*, **285**, 110-113 (1999)
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ : Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome, *Nat. Med.*, **11** (7), 791-796 (2005)
- Lai MM : Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription., *Virology*, **244** (1), 1-12 (1998)
- Shi ST, Lee KJ, Aizaki H, Hwang SB, Lai MM : Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2, *J. Virol.*, **77** (7), 4160-4168 (2003)
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K : Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex, *J. Virol.*, **76** (12), 5974-5984 (2002)
- Pfeifer U, Thomssen R, Legler K, Bottcher U, Gerlich W, Weinmann E, Klinge O : Experimental non-A, non-B hepatitis: four types of cytoplasmic alteration in hepatocytes of infected chimpanzees, *Virchows Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, **33** (3), 233-243 (1980)
- Aizaki H, Lee KJ, Sung VM, Ishiko H, Lai MM : Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts, *Virology*, **324** (2), 450-461 (2004)
- Sakamoto H, Okamoto K, Aoki M, Kato H, Katsume A, Ohta A, Tsukuda T, Shimma N, Aoki Y, Arisawa M, Kohara M, Sudoh M : Host sphingolipid biosynthesis as a target for hepatitis C virus therapy, *Nat. Chem. Biol.*, **1** (6), 333-337 (2005)
- Simons K, Ikonen E : Functional rafts in cell membranes., *Nature*, **387** (6633), 569-572 (1997)
- Gao L, Aizaki H, He JW, Lai MM : Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft, *J. Virol.*, **78** (7), 3480-3488 (2004)
- Kapadia SB, Chisari FV : Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102** (7), 2561-2566 (2005)
- Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T : A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection, *J. Virol.*, **82**, 5715-5724 (2008)
- Umehara T, Sudoh M, Yasui F, Matsuda C, Hayashi Y, Chayama K, Kohara M : Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **346** (1), 67-73 (2006)
- Miyazari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K : The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production, *Nat. Cell. Biol.*, **9** (9), 1089-1097 (2007)
- Sezaki H, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Kobayashi M, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y,

Kumada H : An open pilot study exploring the efficacy of fluvastatin, pegylated interferon and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1b in high viral loads, *Intervirology*, 52, 43-48 (2009)

- 18) Aizaki H, Nagomori S, Aoki Y, Ishii K, Suzuki T, Matsuura Y, Miyamura T : The utilization of human hepatocyte in the study of hepatitis C virus; establishment of the efficient replication system of hepatitis C virus, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 18, 265-278 (1999)

(Received 21 July 2009 ;

Accepted 3 August 2009)

**筆者略歴**

**相崎 英樹 (あいさき ひでき)**



1990年 3月 東京慈恵会医科大学  
医学部卒業

1992年 4月 同大研修了, 同大  
第一内科入局, 国立  
感染症研究所 (旧国  
立予防衛生研究所)  
ウイルス第二部 協  
力研究員

1992年 12月 ウイルス肝炎研究財  
団 流動研究員

1996年 9月 科学技術振興事業団  
科学技術特別研  
究員

1999年 9月 ヒューマンサイエン  
ス振興財団 リサー  
チレジデント

2000年 10月 国立感染症研究所  
主任研究官

2002年~2004年 Howard Hughes  
Medical Institute,  
南カルフォルニア大  
学微生物免疫学教室  
リサーチアソシエ  
イト

Original Article

# Prolonged treatment with pegylated interferon $\alpha$ 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan

Sumio Watanabe,<sup>1</sup> Nobuyuki Enomoto,<sup>2</sup> Kazuhiko Koike,<sup>3</sup> Namiki Izumi,<sup>4</sup> Hajime Takikawa,<sup>5</sup> Etsuko Hashimoto,<sup>6</sup> Fuminori Moriyasu,<sup>7</sup> Hiromitsu Kumada,<sup>8</sup> Michio Imawari<sup>9</sup> and PERFECT Study Group

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine, <sup>2</sup>Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, <sup>3</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, <sup>4</sup>Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, <sup>5</sup>Department of Medicine and Gastroenterology, Tokyo Women's Medical University, <sup>6</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical University, <sup>7</sup>Department of Hepatology, Toranomon Hospital, <sup>8</sup>Department of Gastroenterology, Showa University School of Medicine, Tokyo, and <sup>9</sup>First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan

**Aim:** This study was conducted to clarify the factors related to sustained virological response (SVR) to pegylated interferon  $\alpha$  2b (PEG-IFN) plus ribavirin (RBV) combination therapy administered for 48 weeks in patients with chronic hepatitis C virus (CHCV) and to evaluate the usefulness of prolonged treatment in patients with late virological response (LVR).

**Methods:** Of 2257 patients registered at 68 institutions, those with genotype 1 and high viral load were selected to participate in two studies. Study 1 (standard 48-week group,  $n = 1480$ ) investigated SVR-determining factors in patients who received the treatment for  $\leq 52$  weeks, whereas study 2 compared SVR rates between patients with LVR who received treatment for either 36–52 weeks (48-week group,  $n = 223$ ) or 60–76 weeks (72-week group,  $n = 73$ ).

**Results:** In study 1, SVR rate was 44.9%; that in male subjects (50.4%) was significantly ( $P < 0.0001$ ) higher than in female

subjects (36.4%). SVR rate significantly ( $P < 0.0001$ ) decreased with 10-year age increments in both sexes. Multivariate logistic regression analysis revealed that age, F score, platelet count, and HCV load were SVR-related factors. In study 2, SVR rate in the 72-week group (67.1%) was significantly ( $P = 0.0020$ ) higher than in the 48-week group (46.2%).

**Conclusions:** Patients with CHCV genotype 1 infection should be treated with PEG-IFN plus ribavirin combination therapy as early as possible, and 72 weeks' treatment is recommended in patients with LVR regardless of age.

**Key words:** chronic hepatitis C virus, elderly patients, pegylated interferon, prolonged treatment, ribavirin

## INTRODUCTION

THE TOTAL NUMBER of patients infected with the hepatitis C virus (HCV) is estimated at 170 million worldwide, of whom 1.5–1.7 million are Japanese.

Correspondence: Dr Sumio Watanabe, Department of Gastroenterology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan. Email: sumio@juntendo.ac.jp

Received 28 April 2009; revision 8 June 2009; accepted 11 June 2009.

Treatment of HCV infection began with interferon (IFN) monotherapy before the discovery of HCV in 1989. At that time, responders to treatment were mostly limited to patients with HCV genotypes 2 or 3 infection, which is highly sensitive to IFN. The sustained virological response (SVR: HCV-RNA negative at 24 weeks after end of treatment) to IFN monotherapy in genotype 1 patients known from that time to be difficult to treat was only about 5%. SVR rate has since increased thanks to concomitant administration of the antiviral drug ribavirin (RBV), and with the development of the long-acting

IFN product pegylated interferon (PEG-IFN) it has increased to 50%.<sup>1–4</sup> Today, PEG-IFN plus ribavirin regimen is internationally recognized as a standard therapy for chronic hepatitis C virus (CHCV) infection.<sup>5,6</sup> Early clinical trials of this regimen focused on specific patient populations. Subsequently, several multinational studies such as WIN-R,<sup>7</sup> HALT-C,<sup>8</sup> EPIC3,<sup>9</sup> and REPEAT Study<sup>10</sup> have been conducted in the general clinical setting. The results of the IDEAL Study<sup>11</sup> directly comparing PEG-IFN  $\alpha$  2a versus PEG-IFN  $\alpha$  2b have also been published. From these studies, variables predictive of SVR have been identified, including ethnicity, sex, age, and weight as demographic parameters, staging and hepatic steatosis as histological parameters, viral load, genotype, NS5A, and core mutation as virologic parameters, alanine aminotransferase (ALT) and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) as biochemical parameters, and even the timing of viral negativity as a treatment variable.<sup>12–15</sup> More recently, the SVR rate was reported to increase in association with decrease in the relapse rate with 72-week treatment in patients with delayed HCV-RNA negativity.<sup>15,16</sup> However, the majority of patients participating in previous studies in western countries were aged in their 40s on average, and the influence of aging of the patient population has not been studied adequately.

We therefore examined SVR-determining factors with 48-week PEG-IFN  $\alpha$  2b plus RBV combination therapy in the prevailing Japanese clinical setting characterized by increasing numbers of elderly patients. We also compared SVR rate between 48-week and 72-week treatment in patients with late virological response (LVR) defined as achieving HCV-RNA negativity in the period from weeks 13 to 24 after the start of treatment so as to examine the significance of prolonged treatment.

## METHODS

### Patients

A MULTICENTER STUDY was conducted at 68 institutions in Tokyo and Yamanashi prefectures (PERFECT Study Group; see Appendix I) to survey the actual state of combination therapy with PEG-IFN  $\alpha$  2b (PegIntron; Schering Plough, Kenilworth, NJ) and RBV (Rebetol, Schering Plough) in 2008. A total of 2257 chronic hepatitis C virus (CHCV) patients seen from December 2004 who completed combination treatment by September 2007 were registered regardless of genotype, history of IFN treatment, and ALT levels. The pres-

ence of HCV in serum had to be confirmed by Cobas Amplicor HCV Monitor, version 2.0 (Roche Diagnostic, Tokyo) for registration.

Excluded from this study were pregnant or possibly pregnant and lactating women, and patients with severe heart disease, chronic kidney failure or creatinine clearance of  $\leq 50$  mL/min, current or history of severe psychiatric disorder, and autoimmune hepatitis.

Demographic characteristics examined included age, sex, height and weight, the presence or absence of diabetes mellitus, hypertension, heavy drinking, and history of IFN therapy and hepatic cancer. Hepatic histological data recorded were stage (F0–F4) and grade (A0–A3). Laboratory tests recorded were ALT, platelet count, albumin, and  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) before the start of PEG-IFN  $\alpha$  2b plus RBV combination therapy.

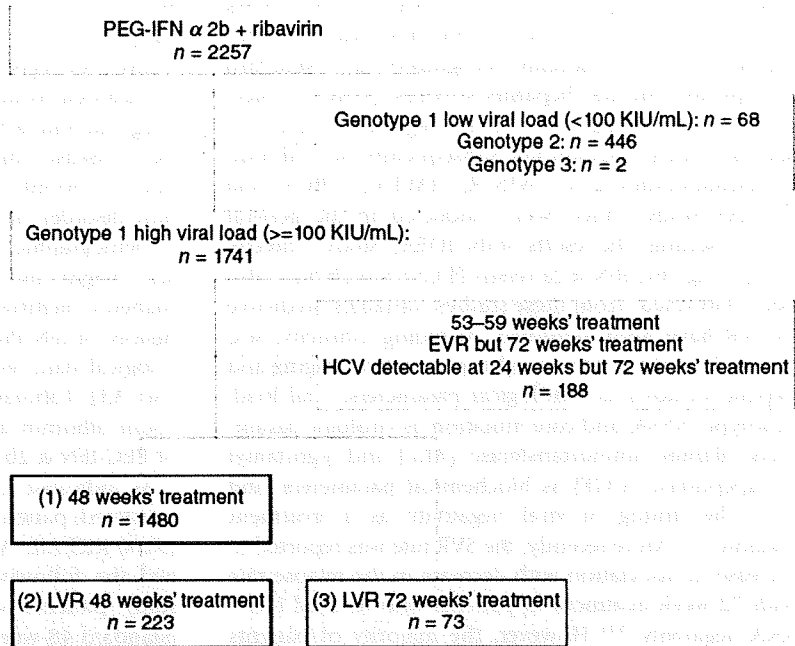
As indicated in Figure 1, of the total 2257 patients registered, patients with genotype 1 and high viral load ( $>100$  KIU/mL: Amplicor PCR quantitation) who satisfied the following conditions were included in this study: patients who received treatment for  $\leq 52$  weeks (standard 48-week treatment group,  $n = 1480$ ) in study 1, and patients with LVR who received treatment for either 36–52 weeks (48-week treatment group,  $n = 223$ ) or 60–76 weeks (72-week treatment group,  $n = 73$ ) in study 2.

This multicenter study was approved by IRB at each participating institution. The study protocol was carried out according to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from each patient.

### Treatment

PEG-IFN  $\alpha$  2b was administered subcutaneously once weekly at a dose of 1.5  $\mu$ g/kg. Dose reduction and treatment discontinuation followed the instructions given in the package insert, i.e., the dose was reduced by half if WBC decreased to  $<1500/\text{mm}^3$ , neutrophils to  $<750/\text{mm}^3$  or platelet count to  $<80000/\text{mm}^3$ , and treatment was discontinued if WBC decreased to  $<1000/\text{mm}^3$ , neutrophils to  $<500/\text{mm}^3$  or platelet count to  $<50000/\text{mm}^3$ . RBV was administered in two divided doses of 600, 800, or 1000 mg/day in patients weighing  $<60$ , 60– $<80$ , and  $\geq 80$  kg, respectively. Dose reduction and treatment discontinuation followed the package insert, i.e., dose was reduced from 600 mg/day to 400 mg/day, from 800 mg/day to 600 mg/day, or from 1000 mg/day to 600 mg/day if hemoglobin (Hb) concentration decreased to  $<10$  g/dL, and administration was discontinued if Hb decreased to 8.5 g/dL. Duration of treatment was 48 weeks as a rule. In LVR patients who did

**Figure 1** Flow-chart of study subjects. (1) 48 weeks' treatment (48-week standard therapy group): patients with genotype 1 and high viral load who received pegylated interferon  $\alpha$  2b (PEG-IFN  $\alpha$  2b) + ribavirin (RBV) for 52 weeks. Multiple logistic regression analysis was used to evaluate the response to PEG-IFN  $\alpha$  2b + RBV in this group (2) Late virological response (LVR) 48 weeks' treatment: patients with genotype 1 and high viral load who received PEG-IFN  $\alpha$  2b + RBV for 36-52 weeks (3) LVR 72 weeks' treatment: patients with genotype 1 and high viral load who received PEG-IFN  $\alpha$  2b + RBV for 60-76 weeks. SVR rate was compared between LVR 48 weeks' treatment group (2) and LVR 72 weeks' treatment group (3). EVR, early virologic response; HCV, hepatitis C virus.



not achieve HCV-RNA negativity by week 12, treatment could be extended for 48 weeks or longer based on individual patients' desire and investigators' judgment.

**Evaluation of response to treatment**

Determination of genotype and measurement of HCV-RNA levels were performed at each center. Pre-treatment HCV-RNA levels were determined by Amplicor PCR quantitation. Viral negativity was defined as HCV below detection limit (<50 IU/mL) by Amplicor qualitative analysis (Roche Molecular Systems, NJ).

SVR was defined as HCV below detection limit at 24 weeks after the end of PEG-IFN  $\alpha$  2b plus RBV combination therapy by Amplicor HCV qualitative analysis.

**Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using SAS, version 9.13 (SAS Institute, Cary, NC). Intergroup comparison of SVR rate was performed by Fisher's exact test; that of background variables by Fisher's exact test and Mann-Whitney *U*-test. Trend of SVR rate by age was assessed by Cochran-Armitage test, and intergroup comparison after adjustment of stratification factors was conducted by Mantel-Haenszel method. Determination of factors associated with SVR was conducted by a stepwise procedure using the results of logistic univari-

ate analysis ( $P < 0.2$ ) into logistic multivariate analysis. All tests were two-sided, with significance level set at  $P < 0.05$ .

**RESULTS**

**Study 1: SVR-related factors in patients receiving standard 48-week treatment**

AS INDICATED IN Table 1 and Figure 1, 1480 subjects (male,  $n = 898$  [60.7%]; median age, 57 [range, 13-79] years) were eligible for analysis. SVR rate based on ITT was 44.9%. SVR rate in subjects who completed and who discontinued treatment was 56.5% ( $n = 1110$ ) and 10.3% ( $n = 370$ ), respectively, a statistically significant difference ( $P < 0.0001$ ). SVR rate in male subjects (50.4%; 453/898) was significantly ( $P < 0.0001$ ) higher than in female subjects (36.4%; 212/582). SVR rate significantly ( $P < 0.0001$ ) decreased as age increased by 10 years in both male and female subjects (Fig. 2); the odds ratio for SVR decreasing with 10-year increase in age was 0.688 (95% CI, 0.604-0.784;  $P < 0.0001$ ) in male subjects and 0.546 (0.449-0.663;  $<0.0001$ ) in female subjects, indicating that the influence of aging was greater in female than in male subjects. There was no bias of older versus younger age among patients who had and had not previously

**Table 1** Pretreatment characteristics of chronic hepatitis C virus (CHCV) patients with HCV-1b RNA who received pegylated interferon  $\alpha$  2b + ribavirin standard therapy for 48 weeks

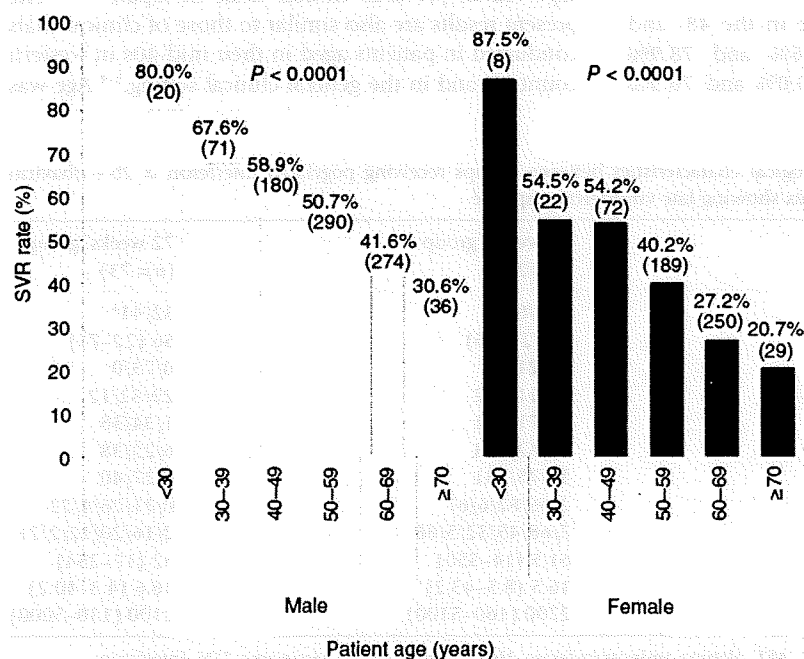
Characteristic	Value (n = 1480)
Sex (male/female)	898/582
Age (years)	57 (13–79)
History of HCC (yes/no/unknown)	8/1405/67
Previous IFN treatment (yes/no/unknown)	459/688/333
Diabetes (yes/no/unknown)	44/480/956
Hypertension (yes/no/unknown)	105/417/958
Ongoing alcohol use (yes/no/unknown)	157/456/867
Grade (A0/A1/A2/A3/unknown)	14/499/478/55/434
Stage (F0/F1/F2/F3/F4/unknown)	36/469/316/176/48/435
ALT (IU/L)	63 (8.4–910)
Platelets ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	16.6 (4.3–47.7)
Viral load (KIU/mL)	1900 (100–5100)

Data expressed as median (range). HCC, hepatocellular carcinoma; ALT, alanine aminotransferase; IFN, interferon.

received IFN. Whereas, multivariate logistic regression analysis revealed that older age (<55/ $\geq$ 55 years), degree of progression of hepatic fibrosis (F0–1/2–4), low platelet count ( $\geq 16$ / $<16 \times 10^4/\mu\text{L}$ ), and high viral load (<1900/ $\geq$ 1900 KIU/mL) are resistance factors to SVR (Table 2). In multivariate logistic regression analysis, sex was not selected.

### Study 2: usefulness of prolonged treatment in LVR patients

Of the patients who completed standard 48-week treatment, 223 patients (20.0%) showed LVR (Fig. 1), and median duration of treatment was 48 weeks. Compared with patients who exhibited early virologic response (EVR) defined as HCV-RNA negative within 12 weeks after the start of treatment, those with LVR were older (median age, 58 vs 55 years;  $P = 0.0043$ ) and had higher viral load (median, 2700 vs 1620 KIU/mL;  $P < 0.0001$ ) and lower platelet count (median, 16.5 vs  $17.3 \times 10^4/\mu\text{L}$ ;  $P = 0.0162$ ). SVR rate based on treatment analysis was 56.5 in all, 79.2% in EVR and 46.2% in LVR, respectively. In multivariate logistic regression analysis of SVR-related factors in LVR patients who completed standard 48-week treatment, age (10-year groups) was selected as a significant factor.



**Figure 2** Sustained virological response (SVR) rate to 48 weeks' standard treatment with pegylated interferon  $\alpha$  2b (PEG-IFN  $\alpha$  2b) + ribavirin in male and female patients stratified by age. Cochran–Armitage test was used to study the underlying trend.