

図3 C型慢性肝炎におけるγ-GTP値別のpegIFNα-2b+ribavirin併用療法の有効率

解析〔説明変数：性，年齢，IFN治療歴，ウイルス(HCV RNA)量，alanine aminotransferase (ALT)値，γ-GTP値，アルブミン値，白血球数，血小板数，ヘモグロビン，空腹時血糖値〕にて検討した。Genotype 1型で有効に寄与した因子は，男性，低年齢，低ウイルス量，血清アルブミン高値，血小板数高値，γ-GTP低値，空腹時血糖低値で，genotype 2型では治療歴がないことおよび低ウイルス量であった(表2)。いずれのgenotypeでも高ウイルス量は治療効果を低下させる因子であり，その他genotype 1型では性・年齢などの宿主因子，さらには肝病態因子および生活習慣病因子の悪化が治療効果を低下させる重要な因子であった。

有効を得るに必要十分な pegIFNα-2bおよびribavirinの投与量

著者らはKULDSの成績から検討した結果，genotype 1型に対しては十分な治療量が必要であり，pegIFNα-2bは体重規定総投与量の80%以上，ribavirin量が60%以上が必要であるが，genotype 2型については投与量と有効率は関連ないことをすでに報告した³⁾。その確認のため，本論文で用いた症例数でも検討したが，genotype 1型では体重規定総投与量の80%以上およびribavirin量は60%以上を満たす340例での有効率は62.6%で，この条件を満たさない599例での28.2%に比

較して有意に高率であった($P<0.0001$)。

HCV RNA陰性化遅延例に対する pegIFNα-2b+ribavirin併用療法の 期間延長

PegIFNα-2b+ribavirin併用療法開始後，血中HCV RNAが早く陰性化した例ほど有効率が高いことが判明した。すなわち，genotype 1型の有効率は治療開始4週目に陰性化した148例では87.8%，12週目までに陰性化した296例では64.9%，24週目までに陰性化した118例では24.6%，48週目までに陰性化した24例では16.7%であった(図4-a)。また，genotype 2型の有効率は，治療開始4週目に陰性化した223例では89.2%，12週目までの陰性化した53例では67.9%，24週目までに陰性化した3例では33.3%と有意な低下傾向がみられた(Cochran-Amitage trend test：いずれも $P<0.0001$) (図4-b)。以上のことから，HCV RNA陰性化が遅い例，とくにgenotype 1型かつ高ウイルス量のC型慢性肝炎に対する治療の延長が議論され，現在，治療開始13週目から36週目までにHCV RNAが陰性化した，HCV RNA陰性化遅延例に対しては，本療法を72週まで延期することが保険適応となっている。

著者らはgenotype 1型かつ高ウイルス量で，患者の希望により72週の延長投与となった31例を48週の標準投与705例と比較したが，有効率は

表2 C型慢性肝炎に対するpegIFN α -2b+ribavirin併用療法による有効に及ぼす背景因子(多変量解析)

説明変数	カテゴリー	Odds比	95%信頼区間		P値	
			下限	上限		
<Genotype 1型> 性	男性	1				
	女性	0.518	0.370	0.725	0.0001	
	年齢	<65歳	1			
		≥65歳	0.342	0.232	0.504	<0.0001
	HCV RNA量(log IU/ml)	<6	1			
		6~7	0.305	0.205	0.455	<0.0001
		≥7	0.426	0.263	0.689	0.0005
	γ -GTP値(IU/l)	<44	1			
		≥44	0.404	0.289	0.565	<0.0001
	アルブミン値(g/dl)	≥3.5	1			
<3.5		0.275	0.114	0.661	0.0039	
血小板値($\times 10^4/\mu$ l)	≥15	1				
	<15	0.555	0.403	0.764	0.0003	
空腹時血糖値(mg/dl)	<95	1				
	≥95	0.560	0.408	0.769	0.0003	
<Genotype 2型> 前IFN治療歴	無	1				
	有	0.518	0.370	0.725	<0.0001	
	CL/F(l/hr)	<8	1			
		8~15	4.667	1.921	11.336	0.0007
		15~25	5.173	1.883	14.208	0.0014
		≥25	4.560	0.795	26.154	0.0886
	HCV RNA量(log IU/ml)	<6	1			
		6~7	0.269	0.112	0.645	0.0032
		≥7	0.193	0.070	0.531	0.0014

延長投与では54.8%で標準投与の48.9%と差はなかった。しかし、この症例のうち12週までに陰性化しなかった301例について検討すると、延長投与では22例中55.4%と標準投与の279例中12.5%に比較し有意に高率であった($P<0.0001$)。以上のように、治療開始早期にHCV RNAが陰性化しない例に対しては、長期に投与したほうが高い有効率が得られることは論を待たないと思われる。

しかし、現在のHCV RNA量はTaqMan法で測定され、低ウイルス量域の感度が改善されたために、さらなる検討が必要と思われる。すなわち、治療開始12週目にAmplicor法にてHCV RNAが陰性であったgenotype 1型80例について、TaqMan法では17例、21.3%が陽性であった。TaqMan法とAmplicor法とによるHCV RNA陰性化時期と有効率を比較検討すると、TaqMan法で2週に陰性であった7例は100%、4週に陰性であった24例は100%、8週に陰性であった24例も100%、12週に陰性であった63例は61.9%の有効

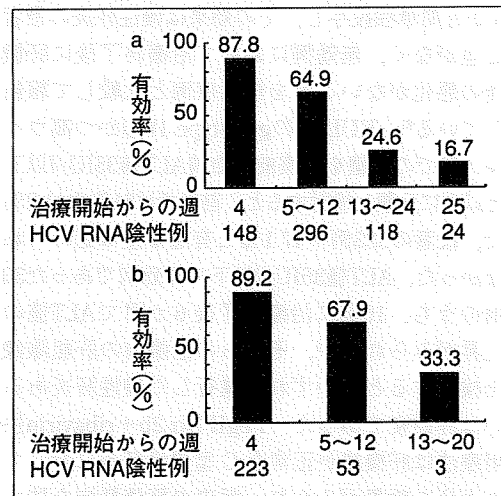


図4 C型慢性肝炎におけるウイルス陰性化時期別のpegIFN α -2b+ribavirin併用療法の有効率
a: genotype 1型 939例, b: genotype 2型 313例。

率であった。一方、Amplicor法で2週に陰性であった8例は87.5%、4週に陰性であった25例は80%、8週に陰性であった46例は69.6%、12週に

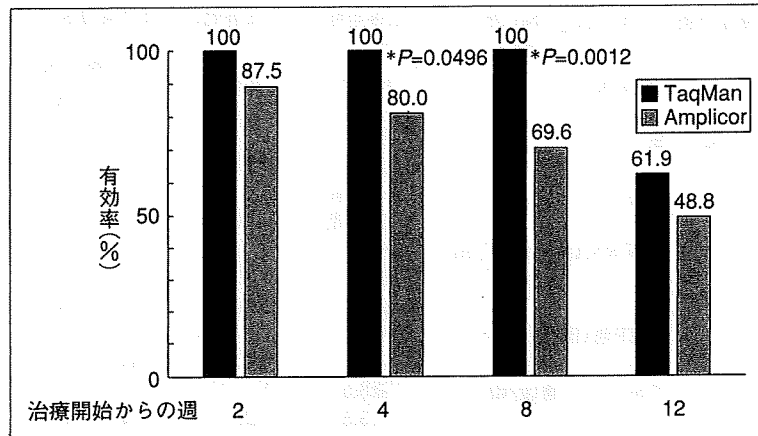


図5 治療開始12週までにAmplicor法によりHCV RNA陰性と判定された80例のTaqMan法による結果と有効との関連

陰性であった80例は48.8%の有効率であった。4週と8週での陰性例の有効率は、TaqMan法が有意に高率であり、TaqMan法で8週目までに陰性化した例は有効例となる確率が非常に高いことも推定された(図5)⁹⁾。

肝機能正常例に対する治療

著者らは肝機能正常例に対して天然型IFN α を6か月間単独投与し、その効果は慢性肝炎の患者と差がなく、無効例において治療終了後に肝機能の悪化がないことを無治療例と比較して報告している⁶⁾。KULDSのgenotype 1b型かつ高ウイルス量での成績を治療前の血清ALT値35IU/l以下と以上に分類し検討すると、前者では51例中41.2%で、後者の323例中47.1%と有意な差は認められなかった。ALT値35IU/l以下で無効例であった30例のうち、10例に治療終了後6か月でALT値の上昇がみられたが、それらの治療前の肝組織像を検討すると、いずれも進行した慢性肝炎あるいは肝硬変であった。PegIFN α -2b+ribavirin併用療法は肝機能が正常なC型慢性肝炎に対しても十分な効果がみられ、将来の肝癌発症を防止する意味でも推奨できる治療と考えられた。

PegIFN α -2b+ribavirin併用療法の副作用

KULDSで解析できたgenotype 1型939例における治療中断は273例29.1%で、その内訳は治療無効予測による中断が20.1%と最も多く、次

いで全身倦怠感17.2%、うつ状態8.4%、経済的問題含む患者の都合8.8%、皮疹4.4%、貧血3.7%であった。一方、genotype 2型313例における治療中断は38例12.1%で、その内訳は経済的問題含む患者の都合が15.8%と最も多く、次いで全身倦怠感および皮疹が13.2%、うつ状態、貧血、白血球減少および血小板減少が5.3%であった。治療中断例はgenotype 1型の方がgenotype 2型に比較し有意に高率であったが($P<0.001$)、その理由としては、genotype 1型に対しては治療期間が長く有効率も低いため、主治医としては患者の身体的・経済的負担を考慮し、早めに治療効果の予測を行う傾向がある。その結果としてgenotype 1型に治療無効予測による中断が多くなったと考えられる。

上述したように、genotype 1型に対しては十分量の治療が必要であり、副作用対策が重要な問題となる。著者らはIFN β の6~8週投与に対して、漢方薬である麻黄湯の投与が発熱などの副作用をコントロールできることを報告しているが³⁸⁾、pegIFN α -2b+ribavirin併用療法は48週間以上の長い治療期間であるため、時期により副作用症状(漢方医学的には「症」)が異なったり、変化したりする。そのため同一の漢方薬では副作用をコントロールすることは困難であり、著者らは漢方専門医と相談し、随時に「症」をとる、漢方薬の随症治療を行い、pegIFN α -2b+ribavirin併用療法を完遂させるよう努力している。その

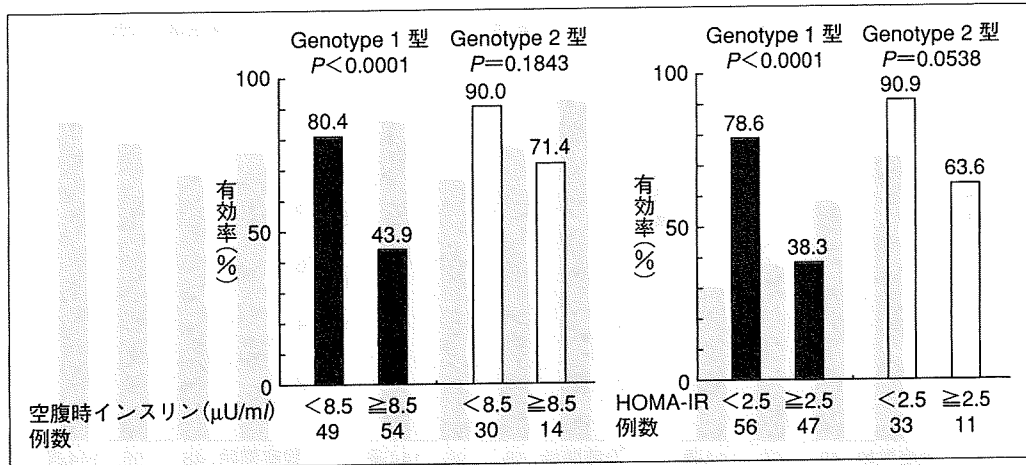


図6 C型慢性肝炎(genotype 1型103例, 2型44例)におけるpegIFNα-2b+ribavirin併用療法の有効率と空腹時インスリン値およびHOMA-IRとの関連

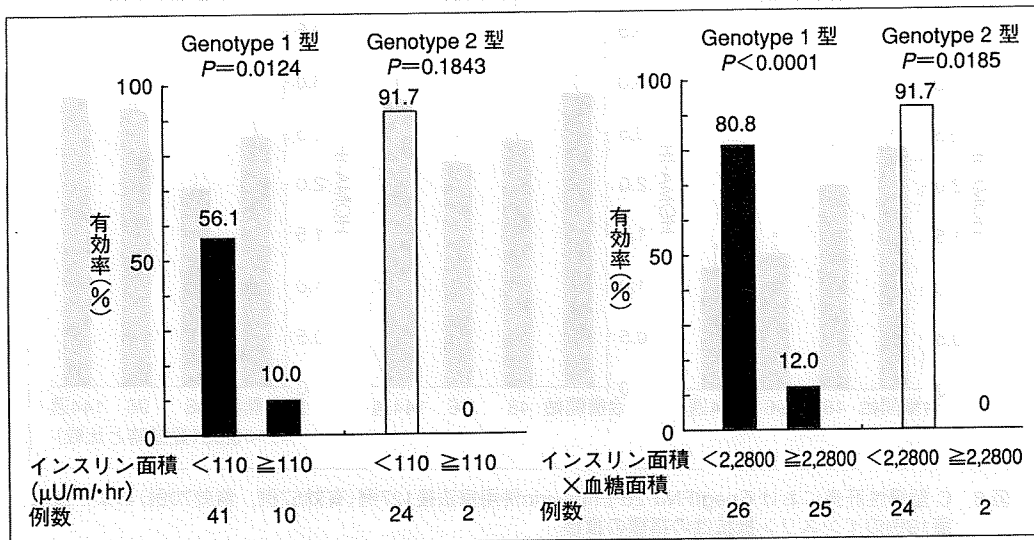


図7 食後負荷試験(クッキーテスト)を施行したC型慢性肝炎(genotype 1型51例, 2型26例)におけるpegIFNα-2b+ribavirin併用療法の有効率と血糖面積および血糖面積×インスリン面積との関連

際の漢方薬としては陰虚症適応方剤, 駆於血方剤が有効である可能性が高い。

C型慢性肝炎におけるインスリン抵抗性とpegIFNα-2b+ribavirin併用療法の効果

HCVトランジェニック・マウスに高脂肪食を摂取させると糖尿病を発症したが, 非感染マウスでは発症しないことと, その原因としてインスリン抵抗性が関係していることが報告されている⁹⁾. 著者らはC型慢性肝炎患者に対して食

事負荷試験(クッキーテスト: 糖質75g, 脂肪28.5g, 蛋白質7g, 計585kcal)⁹⁾を経口投与し, HOMA-IRだけでなくインスリン面積, インスリン面積×グルコース面積を指標としてインスリン抵抗性を検討した. いずれの指標でもC型慢性肝炎患者では, コントロール(高血圧患者)に比較して高値であった¹⁰⁾. また, HCV RNA量は種々のインスリン抵抗性の指標と有意な関連がみられるだけでなく, 高分子量アディポネクチンとは逆相関がみられ, HCV感染とインスリン抵抗性との関連が強く示唆された¹¹⁾. また, イン

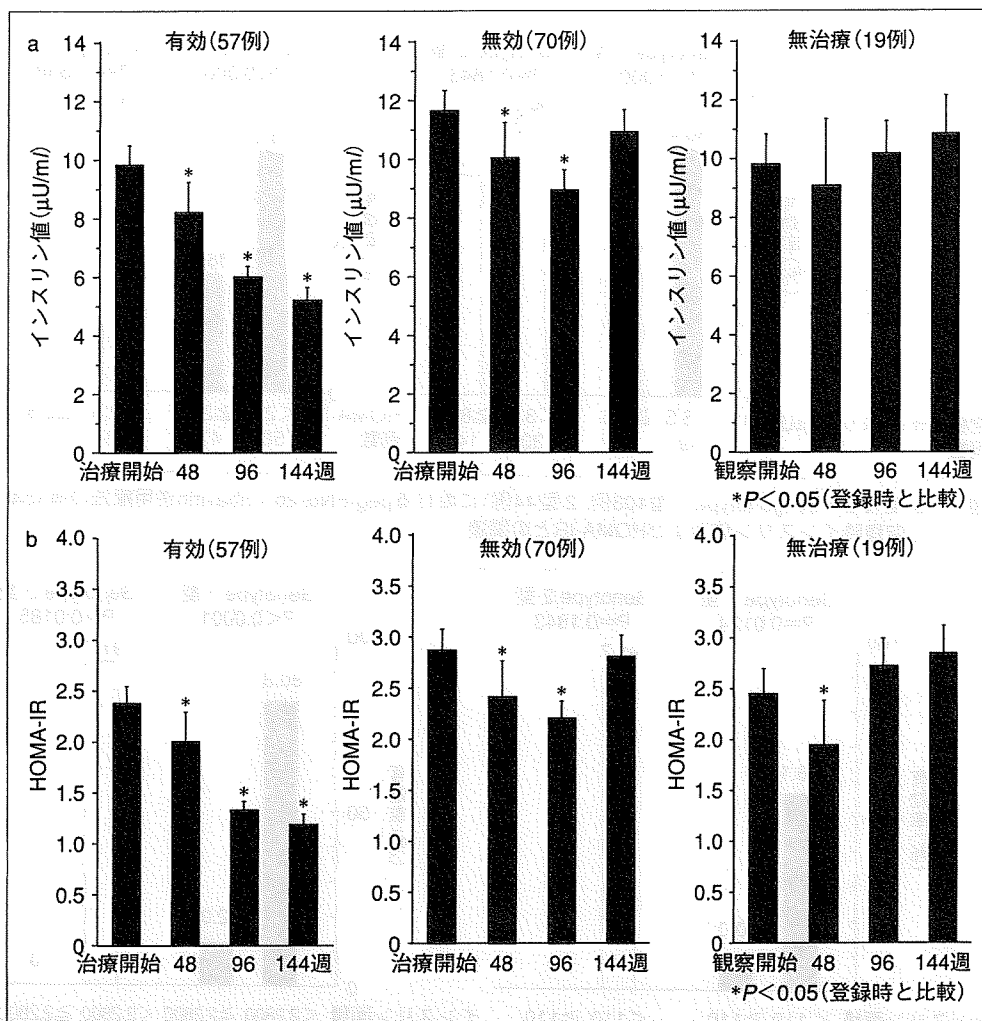


図8 C型慢性肝炎におけるpegIFN α -2b+ribavirin併用療法後127例(有効57例, 無効70例)および無治療19例のインスリン抵抗性の指標の推移

a: 空腹時インスリン値の推移, b: HOMA-IRの推移。

スリン抵抗性はIFN治療に対する反応性にも影響を与えるという報告がなされている。肝臓の脂肪化は抗ウイルス治療効果において負の因子であることは1996年に最初に報告され, 最近の研究で治療前のHOMA-IRと有効率が逆相関することが示された。

著者らもC型慢性肝炎に対するpegIFN α -2b+ribavirin併用療法の効果とインスリン抵抗性との関連を検討した。Genotype 1型では, 有効率は血清空腹時インスリン値が $8.5\mu\text{U}/\text{mL}$ 以下で80.4%と $8.5\mu\text{U}/\text{mL}$ 以上の43.9%に比較し有意に高

率であり, HOMA-IRが2.5以下では78.6%と2.5以上の38.3%に比較して有意に高率であった(いずれも $P < 0.0001$)。Genotype 2型44例では, 有効率はインスリン値が $8.5\mu\text{U}/\text{mL}$ 以下で90.0%と $8.5\mu\text{U}/\text{mL}$ 以上の71.4%に比較し高率であったが有意差は認められず, また, HOMA-IRが2.5以下では90.0%と2.5以上の63.6%に比較して高率であったが, 有意差は認められなかった(図6)¹⁰⁾。

さらに, 前述の食事負荷試験が施行されたgenotype 1型51例(有効24例, 無効27例)およびgenotype 2型26例(有効24例, 無効2例)につい

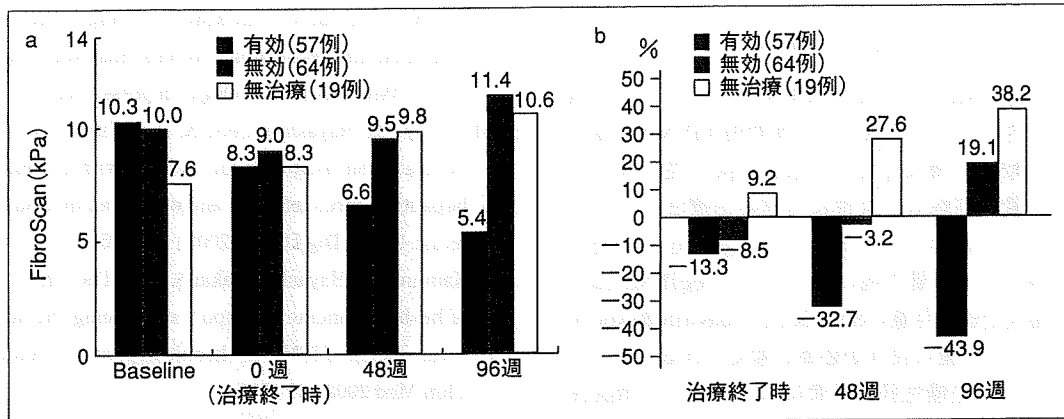


図9 C型慢性肝炎におけるpegIFN α -2b+ribavirin併用療法による有効57例と無効69例および無治療19例のFibroScan値の推移
a: FibroScan値の推移の比較, b: 治療前に対する変化率の比較。

てpegIFN α -2b+ribavirin併用療法の効果とインスリン抵抗性との関連を詳細に検討した。Genotype 1型の有効率をインスリン面積($\mu\text{U}/\text{ml}\cdot\text{hr}$)でみると110以下の41例では56.1%と、110以上の10例中10.0%に比較し有意に高率で($P<0.05$)、インスリン面積 \times 血糖面積($\mu\text{U}/\text{ml}\cdot\text{mg}/\text{dl}\cdot\text{hr}^2$)でみると22,800以下の26例では80.8%と、22,800以上の25例中12.0%に比較し有意に高率であった($P<0.0001$)。Genotype 2型ではインスリン面積110以下あるいはインスリン面積 \times 血糖面積22,800以下は24例で、有効率は91.7%であり、それぞれの値が110以上あるいは22,800以上の2例中0.0%に比較して有意に高率であった($P<0.05$) (図7)¹⁰。

また、genotype 1型のC型慢性肝炎に対するpegIFN α -2b+ribavirin併用療法の有効性にとって γ -GTPは負の因子であったと上述したが、その原因として γ -GTP値はHOMA-IR($r=0.324, P<0.0001$)およびbody mass index($r=0.191, P<0.0001$)と正の相関を示していたことから、 γ -GTPが本治療における負の因子であったことはインスリン抵抗性と関連したものと考えられた。

さらに、pegIFN α -2b+ribavirin併用療法を受けたC型慢性肝炎患者のインスリン抵抗性を経時的に観察すると、HCVが完全に排除された有効例では血清空腹時インスリン値の低下(図8-a)あるいはHOMA-IRの改善がみられ(図8-b)、インスリン抵抗性の改善を認めた¹⁰。また、Kawaguchiら¹²⁾は、このような例では肝細胞内のインスリン

受容体出現が増加していることを報告している。

FibroScanを用いたpegIFN α -2b+ribavirin併用療法後の肝臓病態の継続的検討

著者らはpegIFN α -2b+ribavirin併用療法を受けた患者の肝臓の病態の継続的な検討を、肝線維化を評価するために、近年新しく開発された機器FibroScan (Echosens, Paris, France)を用いて行った。FibroScan値がC型慢性肝炎の肝生検組織像のStage分類およびGrade分類と正の相関を示すことはすでに証明されている¹³⁾。

治療が有効であった57例のFibroScan値は治療開始時10.3、終了時8.3、終了後48週6.6、終了後96週5.4と経時的に低下し、最終的な変化率は-43.9%であった。これは無効64例の10.0、9.0、9.5、11.4、最終的な変化率+19.1%、および無治療19例の7.6、8.3、9.8、10.6、最終的な変化率+38.2%に比較して有意な組織学的改善率と考えられた($P<0.0001$) (図9)¹⁴⁾。

IFN療法の有効例では、肝生検組織像も改善することはすでに知られているが¹⁵⁾、多くの症例で非侵襲的に長期に肝病態の推移を検討できたことは意義あることと考えられた。すなわち、有効例では長期にわたって組織学的改善が考えられ、無効例でも一時的な改善はみられるが、無治療例では持続的に悪化していることが示唆された。

おわりに

PegIFN α -2b+ribavirin併用療法により、持続的にウイルスが排除される有効例がIFN単独療法に比較して増加したが、genotype 1型、高ウイルス量、高齢者、女性に対する治療法の工夫があるものと考えられる。とくにgenotype 1型かつ高ウイルス量の例に対しては、pegIFN α -2bは体重規定総投与量の80%以上、ribavirin量は60%以上の十分量の投与が必要と考えられる。また、多くのC型慢性肝炎患者にはインスリン抵抗性が存在しており、このため治療の有効率も低下していると考えられるが、ウイルスが消失するとインスリン抵抗性も改善する。また、有効例については長期にわたって肝病態の改善がみられ、pegIFN α -2b+ribavirin併用療法はC型慢性肝炎に対して有用な治療法と考えられた。

文 献

- 1) Hayashi J, Furusyo N, Ariyama I, et al. A relationship between the evolution of hepatitis C virus variants, liver damage, and hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C viremia. *J Infect Dis* 2000 ; 181 : 1523.
- 2) Hayashi J, Kishihara Y, Ueno K, et al. Age-related response to interferon alfa treatment in women vs men with chronic hepatitis C virus infection. *Arch Intern Med* 1998 ; 158 : 177.
- 3) Anand BS, Currie S, Dieperink E, et al. Alcohol use and treatment of hepatitis C virus : results of a national multicenter study. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 1607.
- 4) Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, et al. Association between the treatment length and cumulative dose of pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin and their effectiveness as a combination treatment for Japanese chronic hepatitis C patients : A project of the Kyushu University Liver Disease Study Group. *J Gastroenterol Hepatol* 2008 ; 23 : 1094.
- 5) Ogawa E, Furusyo N, Toyoda K, et al. Excellent superiority and specificity of COBAS TaqMan HCV assay in an early viral kinetic change during pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin treatment. *BMC Gastroenterology*. In press 2009.
- 6) Ohmiya M, Hayashi J, Ueno K, et al. Effectiveness of interferon treatment for patients with chronic hepatitis C virus infection and normal aminotransferase levels. *Dig Dis Sci* 2000 ; 45 : 1953.
- 7) Kainuma M, Hayashi J, Sakai S, et al. The efficacy of herbal medicine (Kampo) in reducing the adverse effects of IFN- β in chronic hepatitis C. *Am J Chin Med* 2002 ; 30 : 355.
- 8) Shintani T, Fujie H, Miyoshi H, et al. Hepatitis c virus and diabetes : direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004 ; 126 : 840.
- 9) Okada K, Maeda N, Kikuchi K, et al. Pravastatin improves insulin resistance in dyslipidemic patients. *J Atheroscler Thromb* 2005 ; 12 : 322.
- 10) 林 純. C型肝炎ウイルス感染と糖尿病. *糖尿病* 2009 ; 1 : 135.
- 11) Furusyo N, Sawayama Y, Maeda S, et al. High molecular weight of adiponectin levels in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 2007 ; 37 : 1052.
- 12) Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, et al. Clearance of HCV improves insulin resistance, beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 2007 ; 102 : 570.
- 13) Ogawa E, Furusyo N, Toyoda K, et al. Transient elastography for patients with chronic hepatitis B and C virus infection : Non-invasive, quantitative assessment of liver fibrosis. *Hepatol Res* 2007 ; 37 : 1002.
- 14) Ogawa E, Furusyo N, Toyoda K, et al. The longitudinal quantitative assessment by transient elastography of chronic hepatitis C patients treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *Antiviral Res* 2009 ; 83 : 127.
- 15) 岸原康浩, 林 純, 中島孝哉, ほか. インターフェロン投与によりHCV-RNAが陰性化したC型肝炎の組織学的評価. *臨牀と研究* 1993 ; 70 : 1846.

8. 耐性ブドウ球菌の院内サーベイランスと対策

村田 昌之^{*1)} 下野 信行^{**} 林 純^{*2)}

耐性ブドウ球菌の中で MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) は今なお院内感染の重要な原因菌である。欧米では、入院時に積極的な監視培養 (active surveillance culture) を行い、感染者・保菌者に接触・隔離予防策を講ずる感染対策が推奨されているが、黄色ブドウ球菌中に占める MRSA の割合の高い日本では、その導入は議論を要する。通常は、細菌検査室からの報告に基づく微生物サーベイランスを行うことで、アウトブレイクを早期に察知し、必要に応じて分子疫学的解析を用い感染経路を解明し、感染伝播予防策をとる。筆者等の施設でも行っているパルスフィールドゲル電気泳動 (pulse-field gel electrophoresis : PFGE) 法を代表とする分子疫学的検討は、感染経路のより正確な解明とその後の感染対策に役立つ手法であると考えられた。

Key Words : 耐性ブドウ球菌 / MRSA / 院内感染 / サーベイランス / パルスフィールドゲル電気泳動法

I はじめに

病院内では抗菌薬を使用する機会が多く、結果として薬剤耐性菌が多く存在している。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA)、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: VRSA) などのブドウ球菌以外にも、バンコマイシン耐性腸球菌 (vancomycin resistant enterococci : VRE)、多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* : MDRP)、基質拡張型 β -ラクタマーゼ (extended spectrum β -lactamases : ESBLs) 産生菌、メタロ β -ラクタマーゼ産生菌など院内感染で問題となる菌は増えてきている。

薬剤耐性菌のほとんどは、感染症を発症していなければ必ずしも治療をする必要はないが、基礎

疾患を有する患者が感染症を発症した場合は、有効で安全な抗菌薬が少ないことから重篤かつ難治性となる可能性がある。そのため、アウトブレイクを早期に察知し、耐性菌の感染拡大を防止する対策を講ずる必要が生じる。すなわち早期に対策を講ずるためには、日常から薬剤耐性菌の検出患者数および検出頻度を把握する耐性菌サーベイランスは重要であり、必要欠くべからざるものである。

II 院内感染で問題となる耐性ブドウ球菌

MRSA は 1961 年に英国で初めて報告され、1980 年代以降、日本を含め世界的に増加がみられるようになった¹⁾。さまざまな院内感染対策がとられる中、日本においても今なお院内感染のもっとも主要な菌である。

米国では、ICU (集中治療室) における黄色ブド

Surveillance and prevention for drug-resistant *Staphylococcus aureus*

*九州大学病院総合診療科 ¹⁾ 講師 Masayuki Murata ²⁾ 教授 Jun Hayashi

**九州大学病院免疫膠原病感染症内科 助教 Nobuyuki Shimono

(1709) 89

球菌の60%がMRSAとされ²⁾、日本でも65%と高い³⁾。欧州は国によって差があり、オランダ、デンマークは1%以下、ドイツ14%、フランス33%、英国42%とされている⁴⁾。

MRSAは*mec A*遺伝子によるペニシリン結合タンパク (penicillin binding protein: PBP) の変異 (PBP2') により耐性化し、β-ラクタム薬による細胞壁の合成阻害を受けなくなる。おもに皮膚や鼻咽腔の軟部組織、腸管に存在し、乾燥した環境でも長期間生存できるため、手指や医療器材、汚染環境を介した接触感染を起こす。分離されるMRSAの大部分は保菌状態であるが、基礎疾患を有する患者は感染症発症のリスクが高く、軟部組織や創部の感染症、血流感染、ときに肺炎を引き起こし重症化し、難治性となりやすい。

MRSA保菌者のMRSA感染症発症リスクは、MSSA (メチシリン感性黄色ブドウ球菌) 保菌者よりも約4倍高いことが報告されており⁵⁾、感染症発症防止のためには、MRSA保菌の伝播を防ぐことがもっとも重要である。

市中感染型MRSA (community acquired MRSA: CA-MRSA) は、感染の危険因子が少ない健常人に、壊死性肺炎、敗血症、重症軟部組織感染症を起こすMRSAとして報告された⁶⁾。従来、病院で分離されていた院内感染型MRSA (hospital acquired MRSA: HA-MRSA) と細菌学的特徴が異なるとされ、HA-MRSAが多剤耐性であるのに対し、CA-MRSAはβ-ラクタム薬以外の薬剤に感受性を示す。

感染リスクの高い環境は、学校や幼稚園、保育所、身体接触の多いフットボールなどのスポーツなどで、皮膚の接触により伝播するとされてい

る。米国ではすでにCA-MRSAの占める割合が増加しており、院内発症MRSA血流感染のうち、49%がCA-MRSAであったという報告もあり⁷⁾、今後、日本においてもその動向に注意が必要である。

VRSAは病巣や腸管などで共存するVREの耐性遺伝子*van A*などを獲得することで出現するとされ、2002年以降米国で7株が報告されているのみで、日本での報告はない⁸⁾。報告された症例の特徴として、VRSAとともに*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) のVREが多く検出されており、日本においても院内感染対策上は、*E. faecalis* のVREが検出されている医療機関では、VRSAの出現に警戒が必要と考えられる^{9) 10)}。

III 九州大学病院の薬剤耐性菌サーベイランスと対策

九州大学病院 (以下、当院と略す) の感染制御部 (ICT) では、週1回コアメンバー会議を開催し、医師、専任看護師、臨床検査技師が集まり、表1に示すような薬剤耐性菌の診療科別および病棟別の検出状況 (ベースライン) を把握し、検出率が平均値+2SD (標準偏差) を超えた場合にアウトブ

表1 九州大学病院における耐性菌サーベイランスの主な対象菌種

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)
多剤耐性緑膿菌 (MDRP)
バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)
基質拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌
メタロβ-ラクタマーゼ産生菌

(筆者作成)

MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)

VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*; バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌)

VRE (vancomycin-resistant enterococci; バンコマイシン耐性腸球菌)

MDRP (multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; 多剤耐性緑膿菌)

ESBLs (extended spectrum β-lactamases; 基質拡張型β-ラクタマーゼ)

ICU (集中治療室) PBP (penicillin binding protein; ペニシリン結合タンパク)

MSSA (メチシリン感性黄色ブドウ球菌) CA-MRSA (community acquired MRSA; 市中感染型MRSA)

HA-MRSA (hospital acquired MRSA; 院内感染型MRSA) ICT (感染制御部)

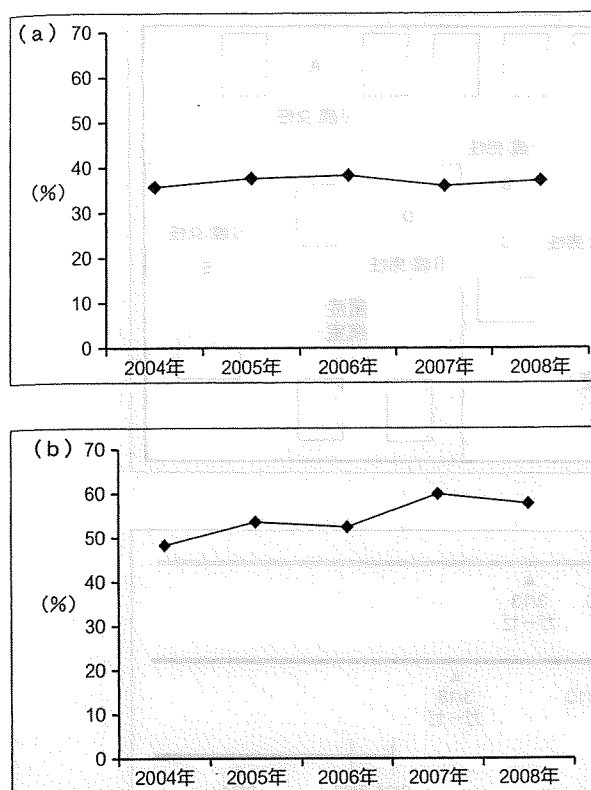


図1 2004年から2008年までの九州大学病院における黄色ブドウ球菌中に占めるMRSAの割合

(a) 全分離菌：MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）の割合は36%前後で推移

(b) 血液分離菌：2004年は48.5%であったが、徐々に上昇し、2008年で57.9%であった。

(筆者作成)

レイクを疑い、対策を講じている。また、ESBL産生菌、メタロβ-ラクタマーゼ産生菌、VRE、MDRPなど院内感染対策の上で早急な対応が必要とされる薬剤耐性菌については、検出された日に細菌検査室から直接、主治医とICTに報告されるようになってきている。その後、ICTが当該病棟に出向き、主治医、病棟感染対策担当医師および看護師と面談し、院内伝播防止のための対策について協議を行っている。

MRSAについては、細菌検査室からの報告に基づく微生物サーベイランスを行っている。週計で新規にMRSAが2例検出された病棟があれば、当該病棟での感染対策の評価、指導を行っている。図1に示すように、2004年から2008年までの期間に検出された全ての黄色ブドウ球菌に占めるMRSAの割合は36%前後で推移しており、全国平均の65%よりも低いことが当院の特徴であ

る。血液分離株で検討すると、2004年は48.5%であったが、徐々に上昇し、2008年で57.9%となっている。

当院では、パルスフィールドゲル電気泳動(pulse-field gel electrophoresis; PFGE)法による分子疫学的解析を、MRSA院内感染のより正確な感染経路の判定と感染対策に役立てている。PFGE法を用いた検討は、通常、アウトブレイクが疑われる場合に行われる。しかし、アウトブレイクと認識されていない状況でもPFGE法によるスクリーニングを行うことにより、小規模な院内感染が日常発生していることを確認できた事例を経験した。

2002年10月から2003年9月までに分離されたMRSA 424株について、同一科または同一病棟ごとにPFGE法によるスクリーニングを行った結果、7事例、19名の院内感染が判明し

PFGE (pulse-field gel electrophoresis ; パルスフィールドゲル電気泳動)

(1711) 91

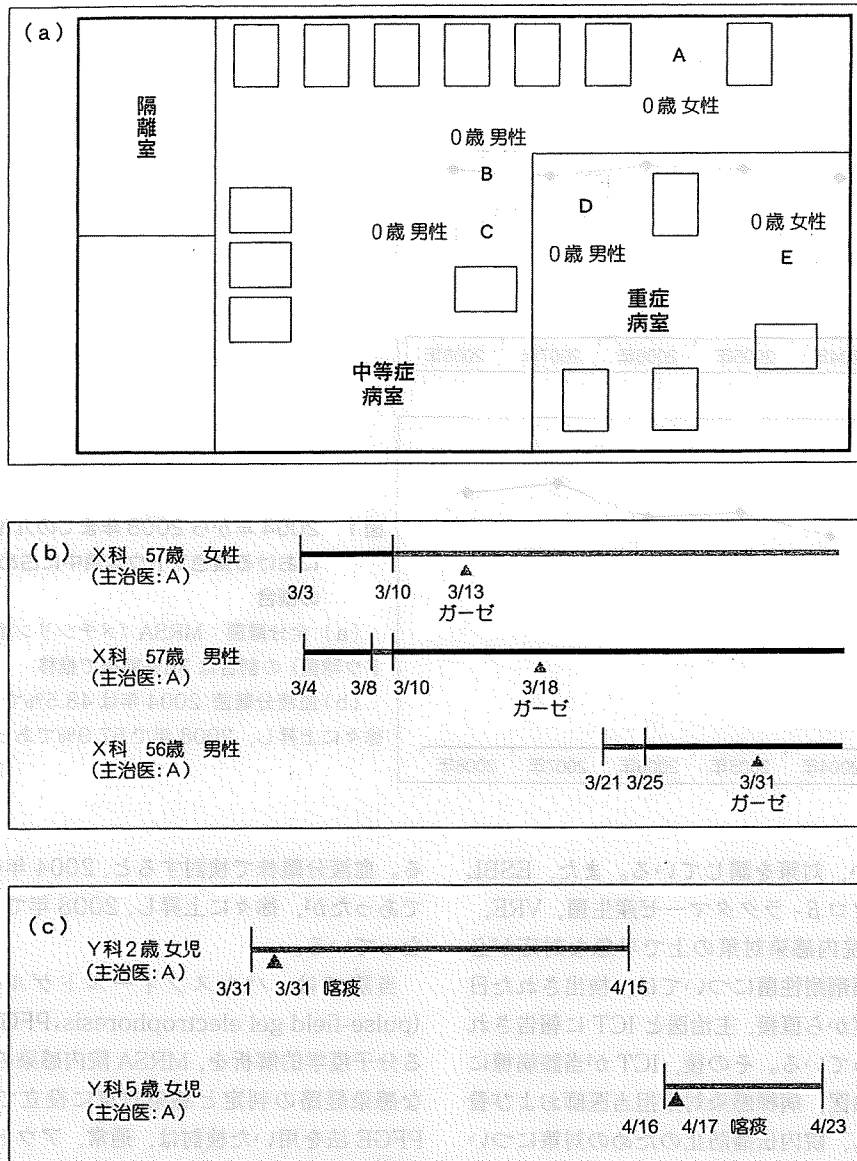


図2 九州大学病院におけるMRSA院内感染の代表3事例(2002年10月から2003年9月までパルスフィールドゲル電気泳動法を用いて検討)

(a) 2002年11月NICU(新生児集中治療室)での事例。同一科の患者5名(A~E)より同一遺伝子型のMRSAが検出された。患者A, D, Eはクベースに入っており、患者Bは気管切開され、喀痰より持続的にMRSAが検出されていた。

(b) 2003年3月事例。同一科より3名の同一遺伝子型MRSAが検出された。主治医・担当医グループが同じであり、創洗浄の際にエプロンを使用しないなど、接触予防策の不備による伝播が考えられた。

(c) 2003年4月事例。同一科で入院時期の異なる患者2名より同一遺伝子型MRSAが検出された。5歳女児は入退院をくり返しており、保菌であった。主治医以外の医療従事者にMRSAが検出されていることの情報伝わっておらず、聴診器などの医療器具が他の患者にも使用されていた。

▲; MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)分離日

(筆者作成)

た。その代表事例を示す。

図2 aはNICU(新生児集中治療室)の事例で、同一科の患者5名(A~E)より同一遺伝子型のMRSAが検出された。患者A, D, Eはクベースに入っており、患者Bは気管切開され、喀痰より持続的にMRSAが検出されていた。回診者を介した伝播が考えられ、患者B, Cの隔離室への移動と接触予防策の徹底を行ったところ、新たな感染事例はなくなった。

図2 bでは、同一科より3名の同一遺伝子型MRSAが検出され、主治医・担当医グループが同じであった。エプロンを使用せず創洗浄を行うなど、接触予防策の不備による伝播が考えられたため、指導を行った。

図2 cでは、同一科で入院時期の異なる患者2名より同一遺伝子型のMRSAが検出された。5歳の女兒は、入退院をくり返していたことと、入院翌日の検体よりMRSAが検出されていたことより保菌状態と考えられた。本事例では、MRSAが検出されていることが主治医以外の医療従事者には伝わっておらず、患者に使用された聴診器や血圧計などの医療器具が別の患者に使用されていたため、感染患者の医療器具の使用についての指導および感染症情報の共有について指導を行った。

7事例の解析の結果、アウトブレイクの認識があったのは1例のみであり、すべての事例で接触予防策の不備が認められた(表2)。これらの結果

表2 2002年10月から2003年9月までのMRSA院内感染7事例のまとめ

<感染の媒介者(重複あり)>	2例
・回診者が疑われた事例	3例
・主治医が疑われた事例	1例
・看護師が疑われた事例	2例
・医療器具が疑われた事例	
<その他>	
・アウトブレイクと認識されていた事例	1例
・MRSA検出について情報共有がなかった事例	1例

(筆者作成)

より、標準予防策、接触予防策の重要性を再認識し、職員への指導を徹底することができた。

その後、2004年9月から2005年3月までの期間にA科でアウトブレイクが発生した。2004年10月以降、新規MRSA検出患者数が増加していたため(図3 a)、標準予防策、接触予防策の遵守を指導していた。しかし、その後も減少を認めなかったため、A科で分離されたMRSA株をPFGE法により解析した結果、6事例、計20名の院内感染と判明した。図3 bに同一のPFGEパターンを示した患者の1事例を示す。6名の患者はいずれも主治医は異なっており、回診や処置時あるいは医療器具を介した接触感染が示唆され、他の5事例においても同様の伝播経路が示唆された。再度、標準予防策、接触予防策の徹底を指導した結果、2005年4月以降、新規MRSAの検出患者数は減少した。

PFGE法などの分子疫学的解析法を使用することで、客観的に院内での感染経路を指摘することができ、感染対策の重要性を強く指導することができると思われる。

易感染性患者に広域スペクトラムの抗菌薬を使用すると、常在細菌叢が抑制され、MRSAを含む薬剤耐性菌が定着しやすくなるため、抗菌薬の適正使用、すなわち感染症発症例に対して早期に十分量の、そして必要な期間の抗菌薬治療を行うように指導している。

当院では病院組織として、抗菌薬の使用届出制、許可制をとっており、カルバペネム系抗菌薬、「抗MRSA薬(バンコマイシン、テイコプラニン、アルベカシン)」を届出制とし、リネゾリドはICTによる使用許可制としている。

IV 欧米の薬剤耐性菌対策と日本における対策

MRSA保菌者の割合がMRSAの院内伝播に強く影響することが報告され¹¹⁾、入院時にすべての患者に対してMRSAのスクリーニングを行い、保菌者・感染者に接触予防策を行う積極的監視培養

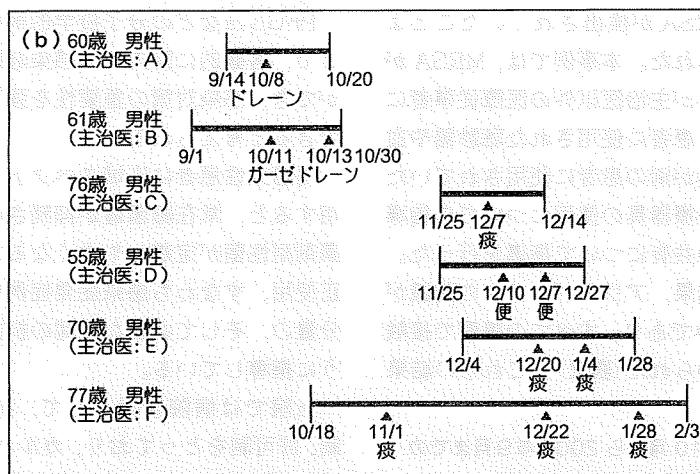
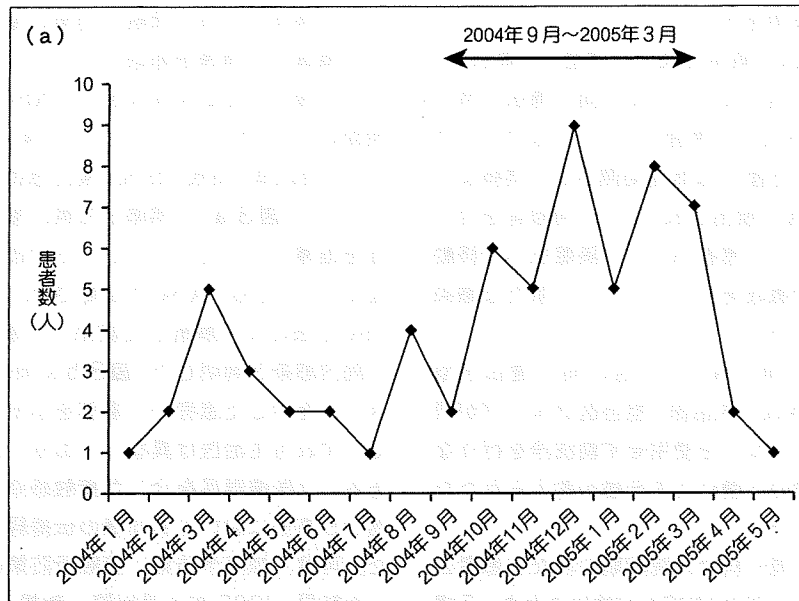


図3 九州大学病院のMRSAアウトブレイク事例

(a) 2004年1月から2005年5月までのA科のMRSA新規分離患者数：2004年10月以降、新規分離患者数の増加を認めた。

(b) 代表事例：主治医が異なる6名の患者より同一遺伝子型のMRSAが検出された。回診や処置、医療器具を介した接触感染が示唆された。

▲；MRSA分離日

(筆者作成)

CDC (Centers for Disease Control and Prevention；米国疾病対策センター)

SHEA (The Society for Healthcare Epidemiology of America；米国医療疫学学会)

94 (1714)

(active surveillance culture) の有効性が議論されている。

オランダ、デンマーク、北欧諸国は、積極的監視培養により MRSA 保菌者の早期発見、隔離、除菌を行う“Search and Destroy”戦略が目覚ましい成果を挙げ、MRSA 耐性率は 1% 以下となった¹²⁾。

米国では、1996年に発表された米国疾病対策センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) のガイドラインに基づく隔離予防策を行ってきたが、MRSA 耐性率は 60% 前後と依然として高値である¹¹⁾。2003年、米国医療疫学学会 (The Society for Healthcare Epidemiology of America: SHEA) は、MRSA と VRE の対策として積極的監視培養による接触予防策を強化する方針を打ち出し⁴⁾、さらに、2006年に CDC が MRSA を含む多剤耐性菌対策のガイドラインを発表した¹³⁾。それによれば、リスクの高い部署で薬剤耐性菌サーベイランスを行い、耐性菌のアウトブレイクあるいは減少をみない場合のみ、高リスク患者に対して積極的監視培養を行い、耐性菌感染者・保菌者、培養結果待ちの患者に対する接触予防策をとるとしている。

いずれにしても、MRSA 対策における積極的監視培養の導入については費用対効果の面も含めて賛否両論あり、その妥当性については議論が残るところである^{14) 15)}。

黄色ブドウ球菌中に占める MRSA の割合の高い日本で、すべての入院患者に対して MRSA のスクリーニング検査を行い、保菌者を隔離することは、ベッド稼働率の高い日本の医療状況や、検査のために多大な費用や人的労力を要することを考えると容易ではない。このため、各医療機関で可能な対策をとることになるが、通常は MRSA 感染兆候あるいは症状を認める患者から検体が提出される微生物サーベイランスを行い、アウトブレイクが疑われる場合の対策や、心臓血管外科などの MRSA 感染症の高リスク群に対して積極的監視培養による接触予防策をとる方針が現実的かもしれない。但し、従来の微生物サーベイランスでは、入院時に MRSA を保菌している患者の 84.1% を

見逃しているという報告や¹⁶⁾、当院での事例で述べたように、アウトブレイクと認識されない小規模な院内感染が日常的に発生していると想定し、普段の標準予防策、接触予防策を徹底することがもっとも重要で確実な感染対策と考えられる。

V おわりに

耐性ブドウ球菌の院内サーベイランスと感染対策について、MRSA を中心に当院での感染事例および欧米の対策を述べた。日本においては、各医療施設において施行可能なサーベイランスを行い、接触予防策、抗菌薬の適正使用を行っていくことが重要である。

文 献

- 1) Boucher HW, et al: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 46: S344-349, 2008
- 2) National Nosocomial Infections Surveillance System: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004 Am J Infect Control 32: 470-485, 2004
- 3) 吉田 勇ほか: 各種抗菌薬に対する臨床分離株の感受性サーベイランス—2000年分離グラム陽性球菌および嫌気性菌に対する抗菌力—. 日化療会誌 51: 179-208, 2003
- 4) Muto CA, et al: SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and enterococcus. Infect Control Hosp Epidemiol 24: 362-386, 2003
- 5) Safdar N, et al: The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. Am J Med 121: 310-315, 2008
- 6) Vandenesch F, et al: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 9: 978-984, 2003
- 7) Popovich KJ, et al: Are community-associated

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? Clin Infect Dis 46 : 787-794, 2008
- 8) Sievert DM, et al : Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. Clin Infect Dis 46 : 668-674, 2008
- 9) 荒川宜親 : [新興・再興感染症 (後篇)] バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) 感染症. 最新医学 63 : 1257-1269, 2008
- 10) Zhu W, et al : Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like vanA plasmids in Michigan. Antimicrob Agents Chemother 52 : 452-457, 2008
- 11) Williams VR, et al : The role of colonization pressure in nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Am J Infect Control 37 : 106-110, 2009
- 12) Verhoef J, et al : A Dutch approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18 : 461-466, 1999
- 13) Siegel JD, et al : Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. Am J Infect Control 35 : S165-193, 2007
- 14) McGinagle KL, et al : The use of active surveillance cultures in adult intensive care units to reduce methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-related morbidity, mortality, and costs : a systematic review. Clin Infect Dis 46 : 1717-1725, 2008
- 15) Edmond MB, et al : Active surveillance cultures are not required to control MRSA infections in the critical care setting. Am J Infect Control 36 : 461-463, 2008
- 16) Lucet JC, et al : High prevalence of carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission in elderly patients : implications for infection control strategies. Infect Control Hosp Epidemiol 26 : 121-126, 2005

薬物代謝からみた肝・腎・心疾患患者への
医薬品投与時の注意

著者 中野 眞汎

薬物代謝からみた 肝・腎・心疾患患者への 医薬品投与時の注意

熊本大学医学部附属病院薬剤部部長 / 教授 中野 眞汎 編

B 5 判 80頁 定価 3,360円(本体 3,200円+税 5%) 送料実費
ISBN4-7532-1938-0 C3047

おもな内容

<p>I. 薬物代謝酵素</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. はじめに 2. 薬物代謝の分類と意義 3. 薬物代謝と CYP 4. CYP の遺伝的多型 5. UGT および NAT の遺伝的多型 6. 薬物間相互作用 7. おわりに <p>II. 薬物代謝に影響し得る因子</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 生理的因子 2. 遺伝的因子 3. 主要臓器の異常 4. 内分泌異常 5. 免疫学的反応 6. 侵襲 7. 外的因子 	<p>III. 肝疾患患者への薬物投与時の注意～薬物代謝面から～</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 薬物の分類 2. 病態別にみた薬物動態変化 3. 肝疾患別にみた薬物動態変化 4. 薬物別にみた薬物動態変化 5. 肝疾患における薬力学変化 <p>IV. 腎疾患患者への薬物投与時の注意～薬物代謝面から～</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. はじめに 2. 腎不全患者における臨床症状と腎機能評価 3. 腎疾患時における薬物動態の変動 4. 腎不全患者への薬物投与計画 5. 高齢者への薬物投与計画 6. おわりに <p>V. 心疾患患者への薬物投与時の注意～薬物代謝面から～</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 心疾患が薬物動態へ与える影響 2. 心疾患患者への薬物投与時の注意
--	---

株式会社 医薬ジャーナル社 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号) 00910-1-33353
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKIビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369

<http://www.iyaku-j.com/> 書籍・雑誌バックナンバー検索, ご注文などはインターネットホームページから便利です。

Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma

Eishiro Mizukoshi¹, Yasunari Nakamoto¹, Kuniaki Arai¹, Tatsuya Yamashita¹, Naofumi Mukaida², Kouji Matsushima³, Osamu Matsui⁴ and Shuichi Kaneko¹

¹Department of Disease Control and Homeostasis, Graduate School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

²Division of Molecular Bioregulation, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

³Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, Tokyo University, Tokyo, Japan

⁴Department of Radiology, Graduate School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

Transcatheter arterial embolization (TAE) destroys a tumor by the induction of necrosis and/or apoptosis and causes inflammation with cytokine production, which may favor immune activation and presentation of tumor-specific antigens. In the current study, we attempted to identify the effect of TAE on tumor-specific T-cell responses and the additional effect of dendritic cell (DC) infusion performed during TAE. The prevalence of tumor antigen-specific T cells was determined by interferon- γ enzyme-linked immunospot analysis using alpha-fetoprotein (AFP) and tumor antigen-derived peptides in 20 and 13 patients with hepatocellular carcinoma (HCC) who received TAE and TAE with DC infusion, respectively. The increased frequency of AFP-specific T cells was observed in 6 of 20 patients after TAE. It was observed more frequently in patients with DC infusion than in those with TAE alone. However, tumor recurrence was not completely prevented in patients albeit displayed enhanced immune responses. The evidence that the enhanced immune responses were transient and attenuated within 3 months was provided in time-course analysis. In conclusion, TAE with DC infusion enhances the tumor-specific immune responses more effectively than TAE alone. Although the effect is not sufficient to prevent HCC recurrence, these results may contribute to the development of novel immunotherapeutic approach for HCC.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies and has gained major clinical interest because of its increasing incidence. Although current advances in therapeutic modalities have improved the prognosis of patients with HCC, the survival rate is still unsatisfactory.¹⁻⁴ One of the reasons for the poor prognosis is the high rate of recurrence after treatment.⁵ Therefore, the development of new antitumor therapies to protect against recurrence is important to improve the prognosis for HCC.

To protect against recurrence, tumor antigen-specific immunotherapy is an attractive strategy. Several recent studies of cancer treatment causing tumor necrosis or apoptosis have shown that they induce the activation of tumor-specific

immune responses.⁶⁻¹⁰ The mechanism to activate host immune responses against tumors is still unknown; however, several studies *in vitro* or *in vivo* suggest that cytokine production, attracting leukocyte infiltration, increase of tumor antigen uptake by macrophages or dendritic cells (DCs) and release of heat shock protein caused by inflammation at the tumor site are associated with the phenomenon.¹¹⁻¹⁷

Transcatheter arterial embolization (TAE) has been used extensively in the Western world and Asia to treat unresectable HCCs.¹⁸⁻²⁰ Although several previous randomized controlled trials have failed to show a survival benefit in patients treated with TAE compared to untreated patients,^{21,22} recent studies demonstrated a survival benefit for TAE *versus* conservative treatment in carefully selected patients.²³⁻²⁵

Histological assessment of resected HCC after TAE shows that the treatment induces necrotic and apoptotic changes in the tumor.²⁶⁻²⁹ Moreover, it is reported that the serum levels of macrophage-colony stimulating factor and the lipopolysaccharide-stimulated production of interleukin-1 beta, IL-6 and tumor necrosis factor-alpha in peripheral whole blood were increased after TAE.³⁰⁻³² Taken together with the previously described knowledge of immune responses after treatment to induce tumor necrosis or apoptosis, these observations support the hypothesis that the induction of apoptotic or necrotic cell death and inflammatory cytokines by TAE favors immune activation and induction of tumor-specific T-cell

Key words: immune response, AFP, CTL, immunotherapy, epitope

Abbreviations: HLA: human leukocyte antigens; IFN: interferon;

HCV: hepatitis C virus; ELISPOT: enzyme-linked immunospot;

TAE: transcatheter arterial embolization; MRP: multidrug resistance-

associated protein; hTERT: human telomerase reverse transcriptase

DOI: 10.1002/ijc.24882

History: Received 17 Feb 2009; Accepted 20 Aug 2009; Online 8 Sep 2009

Correspondence to: Shuichi Kaneko, Department of Disease Control and Homeostasis, Graduate School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, Ishikawa 920-8641, Japan,

Fax: +81-76-2344250, E-mail: skaneko@m-kanazawa.jp

responses. In a previous study, we also made a preliminary report that immune responses specific for tumor antigens were enhanced after HCC treatments.^{7,10} In addition, we have recently developed a new immunotherapeutic approach for HCC using DC infusion performed during TAE, showing the potential to enhance tumor-specific immune responses.⁷

In the current study, we first attempted to identify the effect of TAE for tumor-specific T-cell responses in patients with HCC. Next, we examined the additional effects of DC infusion to the tumor site after TAE. Finally, we analyzed the relationship between clinical characteristics of patients and T-cell responses after TAE and evaluated whether the activation of tumor-specific T-cell responses can prevent HCC recurrence.

Material and Methods

Patient population

The study examined 33 patients with HCC, consisting of 25 men and 8 women ranging from 48 to 83 years old with a mean age of 66 ± 9 years. Twenty patients were treated by TAE. Thirteen patients were treated by TAE with DC infusion as a part of clinical study, which was approved by ethical committee of Kanazawa University Graduate School of Medical Science and registered in September 2003. The patients who received TAE with DC infusion were selected according to the criteria we previously reported.⁷ All subjects were negative for Abs to human immunodeficiency virus (HIV) and gave written informed consent to participate in this study in accordance with the Helsinki declaration.

Treatment of hepatocellular carcinoma

HCCs were detected by imaging modalities such as dynamic CT scan, MR imaging and abdominal arteriography. The diagnosis of HCC was histologically confirmed by taking US-guided needle biopsy specimens, surgical resection or autopsy in 18 cases. For the remaining 15 patients, the diagnosis was based on typical hypervascular tumor staining on angiography in addition to typical findings, which showed hyperattenuated areas in the early phase and hypoattenuation in the late phase on dynamic CT.³³ The tumor size was categorized as "small" (≤ 2 cm) or "large" (> 2 cm), and tumor multiplicity was categorized as "multiple" (≥ 2 nodules) or "solitary" (single nodule). The TNM stage was classified according to the Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) classification system (6th version).³⁴

Twenty patients were treated by TAE as previously described.^{19,35} In brief, after evaluation of the feeding arteries and surrounding vascular anatomy, a microcatheter (Microferret, Cook, Bloomington, IN) was inserted into the segmental or subsegmental artery with a coaxial method using a 0.016-inch guidewire (Radifocus GT wire, Terumo, Tokyo, Japan). A mixture of the anticancer drug and iodized oil was administered, and the feeding artery was embolized with gelatin sponge particles (Gelfoam; Pharmacia Upjohn, Kalamazoo, MI).

The mixture of anticancer drug and iodized oil contained 10–30 mg of Epirubicin (Farmorubicin; Kyowa Hakko Kogyo, Tokyo, Japan), 1–3 ml of iodized oil (Lipiodol Ultra Fluide) and 0.5–1.0 ml of iohexol (Omnipaque 300).

Preparation and injection of autologous DCs

DCs were generated as previously described.⁷ In 6 patients, DCs were pulsed with 0.1 KE/ml OK-432 (Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan), which is a biological response modifier derived from the weakly virulent Su strain of *Streptococcus pyogenes*,^{36,37} for 3 days before injection. The cells were harvested for injection; 5×10^6 cells were reconstituted in 5-ml normal saline containing 1% autologous plasma, mixed with gelatin sponge particles and infused through an arterial catheter following iodized oil injection during TAE.

After TAE or TAE with DC infusion, 26 patients received percutaneous tumor ablation by ethanol injection (PEIT), microwave coagulation (MCT) or radiofrequency (RF). Twenty-one patients were diagnosed with complete necrosis of the tumor lesion using dynamic CT after the completion of treatment. Follow-ups were conducted at outpatient clinics using blood tests and dynamic CT every 3 months for 1 year.

Laboratory and virologic testing

Blood samples were tested for HBsAg and HCVAb by commercial immunoassays (Fuji Rebio, Tokyo, Japan). HLA-based typing of PBMC from patients was performed using complement-dependent microcytotoxicity with HLA typing trays purchased from One Lambda. The serum alpha-fetoprotein (AFP) level was measured by enzyme immunoassay (AxSYM AFP, Abbott Japan, Tokyo, Japan), and the pathological grading of tumor cell differentiation was assessed according to the general rules for the clinical and pathologic study of primary liver cancer.³⁸ The severity of liver disease (stage of fibrosis) was evaluated according to the criteria of Desmet *et al.*³⁹

Interferon- γ enzyme-linked immunospot assay

The prevalence of tumor antigen-specific T cells was determined by interferon (IFN)- γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) analysis (Mabtech, Nacka, Sweden) as previously described.^{10,40} HLA-A24-restricted AFP-derived peptides (10 μ g/ml), which were AFP₃₅₇ (EYSRRHPQL), AFP₄₀₃ (KYIQESQAL) and AFP₄₃₄ (AYTKKAPQL),¹⁰ and 20 μ g/ml AFP derived from human placenta (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan, purity $> 98\%$) were added directly to the wells. These 3 AFP-derived peptides could induce CTLs showing cytotoxicity against hepatoma cells and were frequently recognized by PBMCs of patients with HCC as we previously reported,¹⁰ and therefore, we selected them as an immunogenic peptide. The HLA-A24-restricted AFP and CMV-derived peptides were used only for HLA-A24 or A23 positive patients. Other tumor antigen-derived peptides consisted of MRP3₅₀₃ (LYAWEPSFL), MRP3₆₉₂ (AYVPPQAWI), MRP3₇₆₅ (VYSDADIFL), hTERT₁₆₇ (AYQVCGPPL), hTERT₃₂₄

(VYAETKHL) and hTERT₄₆₁ (VYGFVRACL), which we previously reported that they were useful for analyzing host immune responses to HCC.^{40,41}

PBMCs were added to the wells at 3×10^5 cells/well. In the assay using PBMC depleted CD4⁺ or CD8⁺ cells, the number of cells was adjusted to 3×10^5 cells/well after the depletion. Depletion of CD4⁺ or CD8⁺ cells was performed by MACS separation system using CD4 or CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. After the depletion, 1×10^6 cells were stained with CD4 and CD8 antibodies (Becton Dickinson, Tokyo, Japan) and analyzed by FACSCalibur (Becton Dickinson, Tokyo, Japan) to confirm the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ cells. Data analysis was undertaken with CELLQuestTM software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Plates were analyzed with a KS ELISpot Reader (Zeiss, Tokyo, Japan). The number of specific spots was determined by subtracting the number of spots in the absence of antigen. Responses were considered positive if more than 10 specific spots were detected and if the number of spots in the presence of antigen was at least 2-fold greater than the number of spots in the absence of antigen. Negative controls consisted of incubation of PBMCs with a peptide representing an HLA-A24-restricted epitope derived from HIV envelope protein (HIVenv₅₈₄) and were always <5 spots per 3×10^5 cells.⁴² The positive controls consisted of 10 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) or a CMV pp65-derived peptide (CMVpp65₃₂₈).⁴³ All peptides used in this study were synthesized at Sumitomo Pharmaceuticals (Osaka, Japan). ELISPOT analysis was performed before and 2–4 weeks after TAE. In patients receiving additional treatment for complete ablation of tumor, analysis was performed just before the additional treatment. An increase of antigen-specific T cells was defined as significant when T-cell responses changed to positive or if the number of spots detected after TAE was at least 2-fold greater than the number of spots detected before treatment.

Statistical analysis

Unpaired Student's *t*-test was used to analyze the effect of variables on immune responses in patients with HCC. Fisher's exact test (2-sided *p*-value) was used to analyze the frequency of positive immune responses in patients between with TAE and TAE with DC infusion.

Results

T-cell responses to AFP in the patients who received TAE

The frequency of AFP-specific T cells before and after TAE was tested *ex vivo* in an IFN- γ ELISPOT assay. The serum AFP level and number of peripheral lymphocytes and antigen-specific T cells are shown in Table 1. Before treatment, 2 patients showed a specific T-cell response to AFP-derived peptides and 3 patients to protein in 20 patients (Patients 1–20). After treatment, a T-cell response to AFP-derived pep-

tides and protein was detected in 4 and 3 patients, respectively.

When an increase of antigen-specific T cells was defined as significant if T-cell responses changed to positive or the number of spots detected after TAE was at least 2-fold greater than the number of spots detected before treatment, 6 of 20 (30%) patients (Patients 4, 6, 7, 11, 18 and 20) showed a significant increasing of AFP-specific T-cell frequency after treatment. It was observed even in the patient (Patients 6, 7 and 18) who had no T cells specific to corresponding AFP-derived peptides before treatment. When a decrease of antigen-specific T cells was defined as significant if T-cell responses changed from positive to negative or the number of spots detected after TAE was less than half of the number of spots detected before treatment, 4 of 20 (20%) patients (Patients 5, 14, 15 and 16) showed a significant decreasing of AFP-specific T-cell frequency after treatment.

AFP-specific IFN- γ -producing T cells were also analyzed by ELISPOT assay using PBMC depleted CD4⁺ or CD8⁺ cells to determine what kind of T cells is responsive to whole AFP. Depletion of CD4⁺ or CD8⁺ cells was performed by MACS separation system, and the results were confirmed by flow cytometric analysis (Fig. 1a). After depletion of CD4⁺ or CD8⁺ cells, the ratio of each cell population was decreased to less than 0.1% of PBMCs. The IFN- γ ELISPOT assay showed that IFN- γ -producing T cells against AFP consisted of both CD8⁺ and CD4⁺ cells (Fig. 1b).

To confirm the effect of TAE for host immune responses to HCC, we also examined the frequency of tumor antigen-specific T cells in 4 patients (Patients 5, 8, 10 and 14) using MRP3- or hTERT-derived peptides that we previously identified as useful for analyzing host immune responses to HCC.^{40,41} A significant increasing of MRP3- or hTERT-specific T-cell frequency was observed in all patients after TAE (Table 2).

T-cell responses to AFP in the patients who received TAE with DC infusion

In 13 patients receiving TAE with DC infusion (Patients 21–33), 2 patients showed a specific T-cell response with AFP-derived peptides and 2 patients with protein before treatment (Table 3). After treatment, 8 patients showed a specific T-cell response to AFP-derived peptides and 3 patients to protein.

Next, we compared TAE with DC infusion with TAE alone regarding the effect to AFP-specific immune response. Table 4 shows the clinical features of patients with HCC who received TAE and TAE with DC infusion and they were not statistically different except liver function.

The frequency of patients who showed both positive and increasing T-cell response with AFP-derived peptides or protein after treatment was significantly higher in patients receiving TAE with DC infusion than in those receiving TAE alone (*p* = 0.04) (Fig. 2a). On the other hand, the frequency of patients who showed both positive and increasing T-cell

Table 1. T cell response to AFP and AFP-derived peptides by ELISPOT assay before and after TAE

Patient	HLA	Additional treatment	Complete ablation	AFP (ng/ml)	Before treatment					After treatment								
					Lymph. (μl^{-1})	AFP ₃₅₇	AFP ₄₀₃	AFP ₄₃₄	AFP	CMVpp65 ₃₂₈	TT	AFP	AFP ₃₅₇	AFP ₄₀₃	AFP ₄₃₄	AFP	CMVpp65 ₃₂₈	TT
1	A2	RF	C	<10	1,600	ND	ND	1	ND	0	<10	1,400	ND	ND	ND	0	ND	1
2	A26,A31	RF	C	61	1,700	ND	ND	0	ND	13	23	900	ND	ND	ND	0	ND	0
3	A11,A26	No	-	100	1,700	ND	ND	5	ND	1	50	1,500	ND	ND	ND	0	ND	0
4	A24	RF	C	18	700	0	7	0	6	0	16	500	1	10	1	2	16	
5	A24,A33	RF	C	2,357	1,200	13	2	6	0	13	700	1,100	2	1	1	0	9	0
6	A24	RF	C	14	1,800	0	0	0	0	0	<10	1,400	53	27	38	14	36	108
7	A23,A33	No	-	96	500	0	0	0	5	291	138	800	46	0	0	3	484	0
8	A24,A26	No	-	142	600	1	0	0	0	0	126	500	2	0	0	0	166	1
9	A2,A24	RF	C	<10	700	6	1	0	0	9	<10	700	0	0	0	0	32	15
10	A24	PEIT	C	<10	1,300	8	4	8	8	146	<10	1,300	0	1	1	0	1	1
11	A24,A26	PEIT	N	18	1,100	0	0	0	1	ND	13	400	0	0	0	15	10	55
12	A24,A33	RF	N	11	800	3	2	0	4	94	11	700	0	0	0	0	24	0
13	A11,A24	PEIT	C	52	1,300	0	2	5	1	2	24	1,200	0	0	0	0	0	3
14	A24	RF	C	54	2,400	25	5	4	8	12	67	1,700	0	0	0	0	0	0
15	A2,A24	RF	N	62	1,200	0	3	0	25	2	14	800	0	0	0	8	0	0
16	A3,A24	RF	C	2,876	900	0	1	0	13	0	3,285	700	0	0	0	0	0	0
17	A24,A33	No	-	205	400	4	2	3	2	26	220	100	2	1	0	1	39	1
18	A24,A30	RF	C	18	1,100	4	0	3	8	14	13	900	1	16	1	5	12	0
19	A2,A24	RF	C	330	1,500	2	0	0	0	18	36	1,100	0	4	0	3	8	1
20	A2,A33	RF	C	10	1,400	ND	ND	ND	10	ND	<10	800	ND	ND	ND	31	ND	101

Abbreviations: Lymph., number of lymphocytes; RF, radiofrequency ablation; PEIT, percutaneous ethanol injection therapy; No, no treatment; C, completed; N, not completed; —, not determined; ND, not done. The bold letters show the positive responses in ELISPOT assays.

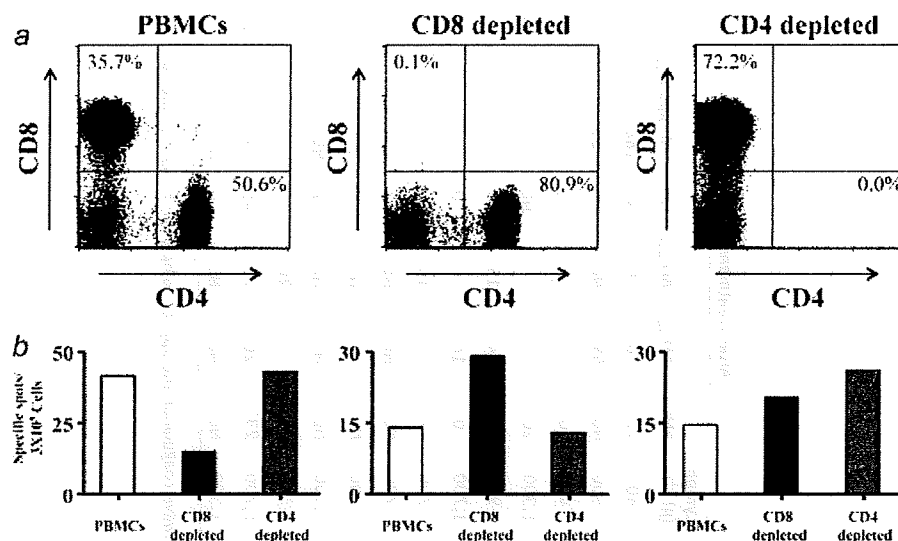


Figure 1. IFN- γ production of CD4- or CD8-depleted T cells against whole AFP. AFP-specific IFN- γ -producing T cells were analyzed by ELISPOT assay using PBMC depleted CD4⁺ or CD8⁺ cells to determine what kind of T cells is responsive to whole AFP. Depletion of CD4⁻ or CD8⁺ cells was performed by MACS separation system and the results were confirmed by flow cytometric analysis (a). IFN- γ ELISPOT assay using nontreated PBMCs and PBMC depleted CD4⁺ or CD8⁻ cells showed that T cells producing IFN- γ against whole AFP consisted of both CD8⁺ and CD4⁺ cells (b). Assays were performed in 5 patients and the representative result is shown.

Table 2. T cell response to other tumor antigen-derived peptides by ELISPOT assay before and after TAE

Patient	Before treatment						After treatment					
	MRP3 ₅₀₃	MRP3 ₆₉₂	MRP3 ₇₆₅	hTERT ₁₆₇	hTERT ₃₂₄	hTERT ₄₆₁	MRP3 ₅₀₃	MRP3 ₆₉₂	MRP3 ₇₆₅	hTERT ₁₆₇	hTERT ₃₂₄	hTERT ₄₆₁
5	2	7	8	0	3.5	7.5	0	0	0	7	3	35
8	6	6	1	3	ND	ND	17	18	22	18	14	9
10	0	1	3	0	5	7	0	4	7	6	11	4
14	6	5	0	9	5	13	6	14	22	8	10	7

Abbreviation: ND, not done. The bold letters show the positive responses in ELISPOT assays.

response with CMV-derived peptide or tetanus toxoid was not different between the 2 groups (Figs. 2b and 2c).

In the comparison of the mean values of spots generated with AFP-derived peptides, protein, CMV-derived peptides or tetanus toxoid, no significant difference was observed between patients with TAE alone before and after treatment (Figs. 3a-3d). In contrast, the mean values of spots generated with AFP-derived peptides were significantly higher in patients after TAE with DC infusion than in those before treatment (Fig. 3e). The mean values of spots generated with protein, CMV-derived peptides or tetanus toxoid were not significantly different between patients before and after TAE with DC infusion (Figs. 3f-3h). Based on the above results, we considered that the main difference between TAE alone and TAE with DC infusion was the response to HLA-A24-restricted AFP-derived epitopes. Therefore, to analyze the difference between TAE alone and TAE with DC infusion more precisely, we selected the patients with HLA-A24 or A23 and

compared the clinical parameters of both groups. However, there were no statistical differences except liver function in the 2 groups (Table 5).

Enhancement of AFP-specific T-cell responses and treatment outcome

To evaluate the effect of immune enhancement by TAE or TAE with DC infusion for the treatment outcome, we analyzed the clinical course of 17 patients who received complete ablation by additional RFA, PEIT or MCT after these treatments and could be followed up using dynamic CT every 3 months (Table 6). Seven patients showed increasing specific spots for AFP or AFP-derived peptides in ELISPOT assay after TAE. HCC recurrence within 3 months after complete ablation was observed in 3 patients who showed increasing AFP-specific T-cell responses after TAE. Furthermore, recurrence within 6 months after complete ablation was observed