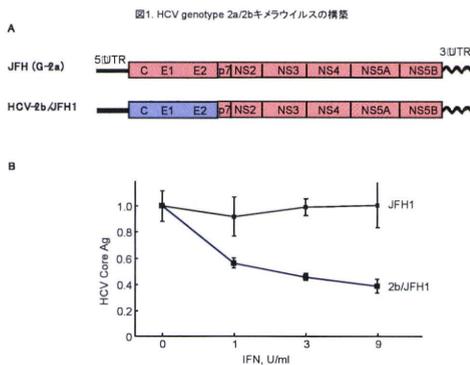
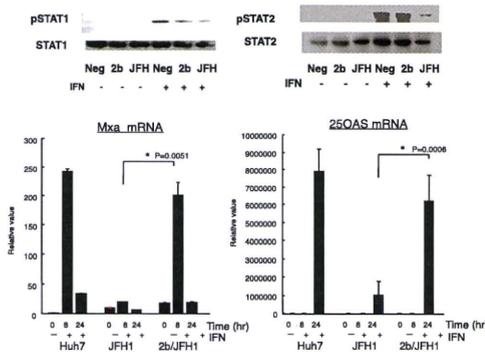


胞へ接種する事により再感染が確認された。更に、培養上清をヒト肝細胞キメラマウスに接種する事により感染が成立する事が確認された。

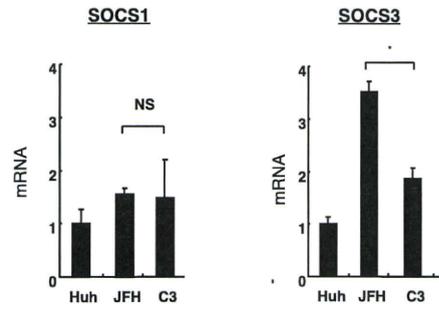
続いて、構築した genotype2b/JFH1 株 (C3 株) と JFH1 株の IFN 感受性の差異の検討を行った。それぞれの HCV 感染後に、IFN を添加し培養上清中のウイルスの減少率を比較検討したところ JFH1 株が C3 株に比して IFN 耐性である事が確認された(図 1B)。



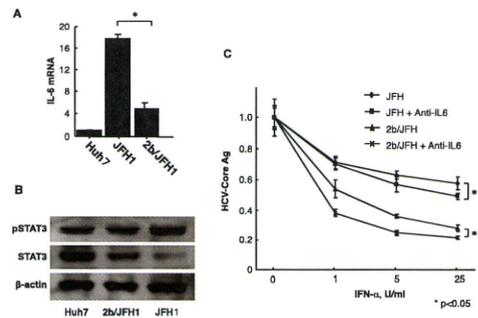
そこで、各 HCV 感染細胞に IFN 添加後の IFN signal 構成因子である STAT1、2 のリン酸化、更にその下流の抗ウイルス作用を有する ISG の発現を比較検討したところ JFH1 株感染細胞で有意にその発現が抑制されていた。



そこで、Jak のリン酸化を阻害する事により STAT1, 2 のリン酸化を抑制する SOCS1、3 の発現を比較検討したところ IFN 耐性であった JFH1 感染細胞内で SOCS3 の発現が mRNA、蛋白レベルともに上昇していた(図 3)。更に、siRNA にて SOCS3 を knock-down する事により IFN に対する耐性が改善する事が確認された。

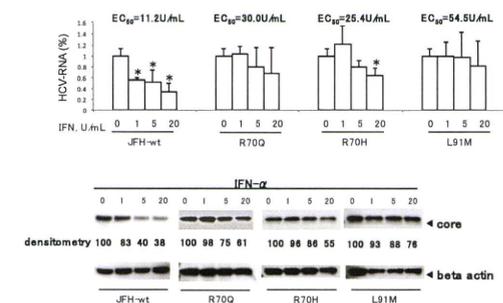


肝細胞においては、SOCS3 は IL6 を介して強力に誘導される事が報告されている。そこで、JFH1、C3 株感染細胞のそれぞれの IL6 の発現を検討したところ JFH1 感染細胞において強く IL6 が発現されている事が確認された。IL6 による SOCS3 発現、更に IFN 感受性への影響を検討する為に IFN 添加前に抗 IL6 抗体にて処理を行ったところ感染細胞内の SOCS3 の発現は有意な低下を認めるとともに、IFN 抵抗性の改善も確認された。



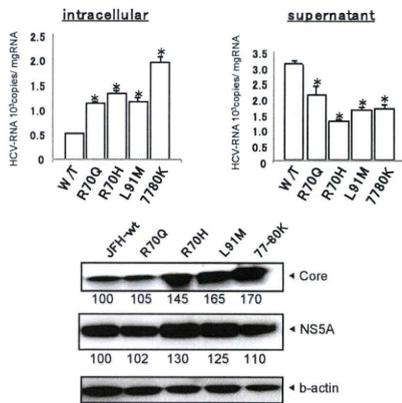
(2) HCV-core 変異株、HCV-R70Q, -R70H および-L91M は、wild 株にくらべ IFN に対し抵抗性が認められた。

IFN sensitivity of core mutant HCV clones



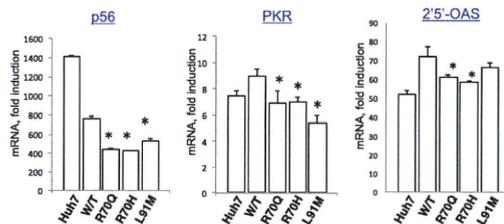
HCV-core 変異株、HCV-R70Q, -R70H および -L91M は、wild 株にくらべ細胞内 HCV-RNA レベルが高い一方で、上清中 HCV 蛋白は HCV-wild に比し低値であり、コア蛋白が細胞内に蓄積する経口が認められた。

Accumulation of mutant core proteins in HCV-infected cells



Core 変異株では IFN 抵抗性が認められ、IFN 伝達経路の抑制因子である SOCS-1, SOCS-3 の発現が野生株に比べて増強しており、25-AS や MXA などの ISG は変異株で低下していた。

IFN-induced activation of ISGs



D. 考察

Core70/91 アミノ酸変異等を導入した HCV 培養系を用いた解析により、C70/91 変異株は細胞内増殖レベルに比し粒子分泌が低下しており、ウイルス蛋白の蓄積傾向が見られた。C70/91 変異株では SOCS1/3 などの高発現とともにリン酸化 STAT1/2 を始めとしたインターフェロン応答能が低下しており、ウイルスの特定領域のアミノ酸変異がインターフェロン不応性を来り、その機序に ER ストレスや IFN 伝達経路の抑制因子が関与している可能性が考えられた。

E. 来年度以降の研究課題

(1) 他のインターフェロン抵抗株 (1b型など) へ解析対象を広げ、in-vitro および in-vivo における増殖能、インターフェロン抵抗性の分子機構などについて解析を進める。

F. 研究発表

英文原著

1. Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Yasuhiro Tanaka, Yuko Sekine-Osajima, Mayumi Ueyama, Masayuki Kurosaki, Nao Nishida, Akihiro Tamori, Yuki Nishimura-Sakurai, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Shuhei Hige, Yoshito Ito, Eiji Tanaka, Yoichi Hiasa, Namiki Izumi, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Mamoru Watanabe: Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. *J Medical Virol* 2010; *in press*.
2. Machi Yamamoto, Naoya Sakamoto (equal contribution), Tetsuya Nakamura, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Seishin Azuma, Kiichiro Tsuchiya, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Mamoru Watanabe: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Research* 2011; *in press*.
3. Xiu Zheng, Kiichiro Tsuchiya, Ryuichi Okamoto, Michiko Iwasaki, Yoshihito Kano, Naoya Sakamoto, Tetsuya Nakamura and Mamoru Watanabe: The suppression of Hath1 gene expression directly regulated by Hes1 via Notch signaling causes goblet cell depletion in ulcerative colitis. *IBD* 2010; *in press*.
4. Michiko Iwasaki, Kiichiro Tsuchiya, Ryuichi Okamoto, Xiu Zheng, Yoshihito Kano, Eriko Okada, Akihiro Araki, Shinji Suzuki, Naoya Sakamoto, Keisuke Kitagaki, Takumi Akashi, Yoshinobu Eishi, Tetsuya Nakamura and Mamoru Watanabe: Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of Hath1 and Klf4. *J Gastroenterol* 2010; *in press*.
5. Masayuki Kurosaki, Naoya Sakamoto, Manabu Iwasaki, Minoru Sakamoto, Yoshiyuki Suzuki, Naoki Hiramatsu, Fuminaka Sugauchi, Akihiro Tamori, Mina

- Nakagawa, Namiki Izumi: Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. *J Medical Virol* 2011; *in press*.
6. Masayuki Kurosaki, Naoya Sakamoto, Manabu Iwasaki, Minoru Sakamoto, Yoshiyuki Suzuki, Naoki Hiramatsu, Fuminaka Sugauchi, Hiroshi Yatsushashi, and Namiki Izumi: Pretreatment Prediction of response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol* 2010; *EPub*.
 7. Masayuki Kurosaki, Yasuhito Tanaka, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Kentaro Matsuura, Yasuhiro Asahina, Fuminaka Sugauchi, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Mamoru Watanabe, Akito Sakai, Masao Honda, Shuichi Kaneko, Kiyooki Ito, Naohiko Masaki, Katsushi Tokunaga, Namiki Izumi, Masashi Mizokami: Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors. *J Hepatol* 2010; *in press*.
 8. Naoya Sakamoto, Yasuhito Tanaka, Mina Nakagawa, Hiroshi Yatsushashi, Shuhei Nishiguchi, Nobuyuki Enomoto, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Nao Nishida, Katsushi Tokunaga, Masao Honda, Kiyooki Ito, Masashi Mizokami, and Mamoru Watanabe: ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 2010; 40(11):1063-1071.
 9. Kaori kameyama, Yasuhiro Nemoto, Takanori Kanai, Tamako Shinohara, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Naoya Sakamoto, Teruji Totsuka, Toshifumi Hibi, and Mamoru Watanabe. L-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4+ IL-7R-high memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol* 2010; 40(9):2423-2436.
 10. Goki Suda, Naoya Sakamoto, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Kako Mishima, Yuko Onuki-Karakama, Machi Yamamoto, Yusuke Funaoka, Takako Watanabe, Kei Kiyohashi, Sayuri Nitta, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Kiichiro Tsuchiya, Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Kazuaki Chayama, and Mamoru Watanabe: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010; 407:80-90.
 11. Yuko Karakama, Naoya Sakamoto, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Shinya Oooka, SeishinAzuma, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Onogi, Masatoshi Hagiwara, and Mamoru Watanabe: Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serin-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agent Chemother* 2010; 54 (8):3179-3186.
 12. Kako Mishima, Naoya Sakamoto, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Kei Kiyohashi, Akiko Kitazume, Kiichiro Tsuchiya, Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Kazuaki Chayama, Takaji Wakita and Mamoru Watanabe: Cell culture and in-vivo analyses of plaque-derived cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010; 405:361-369.
 13. Mina Nakagawa, Naoya Sakamoto, Mayumi Ueyama, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Hiroshi Tanaka, Nobuyuki Enomoto, and Mamoru Watanabe: Mutations in the Interferon Sensitivity Determining Region and virological response to combination therapy with Pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol* 2010; 45(6):656-665.
 14. Yuki Nishimura-Sakurai, Naoya Sakamoto, Kaoru Mogushi, Satoshi Nagaie, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuko Onuki-Karakama, Gouki Suda, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Mayumi Ueyama, Yusuke Funaoka, Takako Watanabe, Cheng-Hsin Chen, Sei Kakinuma, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Tanaka, Nobuyuki Enomoto, Mamoru Watanabe: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways

- in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells. *J Gastroenterol* 2010;45(5):523-536.
15. KyeongJin Kim, Kook Hwan Kim, Hye Young Kim, Hyun Kook Cho, Naoya Sakamoto, JaeHun Cheong: Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway. *FEBS Letter* 2010; 584(4):707-12.
16. Tomokazu Mizui, Shunhei Yamashina, Isei Tanida, Motoki Takashima, Yoshiyuki Takei, Takashi Ueno, Naoya Sakamoto, Kenich Ikejima, Tsuneo Kitamura, Nobuyuki Enomoto, Tatsuo Sakai, Eiki Kominami, Sumio Watanabe: Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol*. 2010 Feb;45(2):195-203.
11. 植山真由美、中川美奈、坂本直哉、渡辺守： IL-6 と肝炎・肝発癌. 肝胆膵 2010; 60(5):849-856.
12. 坂本直哉、中川美奈、渡辺守: 肝疾患における血液生化学検査, IL28B 肝胆膵 2010; 60(4):657-660.

総説

1. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守: シクロフィリン阻害剤. 肝胆膵 2011; in press.
2. 坂本直哉: STAT-C 多剤併用療法: 脱インターフェロン治療なるか? 肝胆膵 2011; in press.
3. 坂本直哉: 新しいインターフェロン製剤: PEG インターフェロンλを中心に. 肝胆膵 2010; in press.
4. 箆島裕子、中川美奈、坂本直哉: HCV の複製・増殖機構と遺伝子型・遺伝子変異. 日本臨床 2010, in press
5. 坂本直哉: インターロイキン 28-29 (IL-28・IL-29)-インターフェロンλ. 臨床免疫・アレルギー科特集: サイトカインのすべて 2010 in press.
6. 箆島裕子、中川美奈、坂本直哉: C 型肝炎の日常診療: 治療の適応、選択の実際. *medicina* 2010;47(3):2010-2103
7. 坂本直哉: PEG-IFN+RBV 非著効例に対する PEG-IFN+RBV の再治療戦略. 日経 CME 2010 年 8 月号別冊.
8. 坂本直哉: 新規治療薬の開発動向. 最新医学 2010; 65(9):1919-1924.
9. 坂本直哉: STAT-C(Specifically Targeted Antiviral Therapy for hepatitis C)開発の動向. 肝胆膵 2010 増刊号: 204-208.
10. 坂本直哉: 膵癌における TGF-β シグナル伝達系の関与. 肝胆膵 2010; 61(1):67-72.

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）
(H22年度) 研究分担報告書

PEG-IFN/RBV 難治例のウイルス学的特徴と新規抗ウイルス療法

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

研究要旨：PEG-IFN/RBV/Telaprevir(TVR) 3 剤併用療法の SVR に影響する治療前のウイルス・宿主要因について検討した。初回治療/前治療再燃/前治療無効例の SVR 率は 76/90/27%。Core aa70 置換(Arg70)と rs8099917(TT 型)が SVR に寄与する独立要因であった。特に、難治が予測される前治療無効例の rs8099917(TG+GG 型)では、Arg70 が SVR 43%であるのに対して当院の Gln70(His70)の症例から SVR 例は確認されず。ウイルス動態に寄与する要因を検討すると、Core aa70/91 置換(Arg70 and/or Leu91)は 24 時間で 3log 以上の RNA 量低下、rs8099917(TT 型)は 12 週の RNA 陰性化に寄与する独立要因であった。この様に、3 剤併用療法においても、宿主要因の *IL28B* 遺伝子多型とウイルス要因の Core aa70 置換を組み合わせることでより精密な治療前効果予測が出来ると思われる。更に、TVR 耐性出現例に対する PEG-IFN/RBV 標準投与の治療効果を検討した結果、通常の治療成績が得られることも確認された。

A. 研究目的

当院では HCV-1b core aa70/91 置換[aa70 の arginine(Arg70)から glutamine(Gln70)もしくは histidine(His70)への置換と、aa91 の leucine(Leu91)から methionine(Met91)への置換]が Peginterferon/Ribavirin(PEG-IFN/RBV)併用療法難治要因であることを報告してきた。今回は新規抗 HCV 療法である PEG-IFN/RBV/Telaprevir(TVR)3 剤併用療法の治療成績と治療効果予測因子について検討した。

B. 研究方法

当院で PEG-IFN α 2b/RBV/TVR を施行された HCV genotype 1 の 81 例(1a 1 例,1b 80 例)を対象として治療効果予測因子を検討した。20 例が 12 週間 study(PEG-IFN/RBV/TVR の 3 剤併用 12 週間投与)、61 例が 24 週間 study(初期 12 週間は PEG-IFN/RBV/TVR の 3 剤併用投与し、その後の 12 週間は PEG-IFN/RBV の 2 剤併用投与)を導入された。検討 1 として全体成績と過去の治療歴別に見た SVR 率を検討。更に、SVR に寄与する独立要因を治療前の 26 因子(ウイルス・宿主・治療要因)を用いて多変量解析(Logistic regression analysis)で検討した。検討 2 として治療開始後 24 時間以内の HCV RNA 量低下、治療中の RNA 陰性化(TaqMan HCV;検出せず)に寄与する要因を多変量解析(Logistic regression analysis)で検討した。ウイルス要因は治療開始前の Core aa70/91 置換・NS5A-ISDR 変異数、宿主要因は *IL28B*(rs8099917,rs12979860)遺伝子多型を含めて検討した。Core(aal-191)・NS5A-ISDR(aa2209-2248)はダイレクトシークエンス法でアミノ酸配列を決定した。

更に、検討 3 として当院で TVR 単独療法 12 週間 study を導入され、NS3 耐性ウイルス出現後に治療中止となり、その後に PEG-IFN α 2b/RBV 標準治療を導入された HCV genotype 1b の 5 例の治療成績を検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

[検討 1]全体 SVR 64%。12 週間 study の SVR 45%、24 週間 study の SVR 70%。初回治療例の SVR 76%、前治療再燃例の SVR 90%、前治療無効例の SVR 27%。SVR に寄与する因子は、単変量解析で Core aa70 置換(Arg70)($P=0.007$)、rs8099917(TT 型)($P<0.001$)、rs12979860(CC 型)($P<0.001$)が有意差を示し、多変量解析では Core aa70 置換(Arg70)($P=0.040$)、rs8099917(TT 型)($P<0.001$)が独立要因として抽出された。特に、前治療無効例において *IL28B* 遺伝子多型に Core aa70 置換を組み合わせると SVR 率を検討すると、難治が予測される TG+GG 型では Arg70 が 43%であるのに対して当院の Gln70(His70)の症例から SVR 例は確認されず。

[検討 2]経時的 RNA 陰性化率は、1 週 1%、2 週 34%、4 週 81%、6 週 91%、8 週 95%、12 週 90%。24 時間で 3log 以上 RNA 量が低下する頻度は、Core aa70/91 置換の Arg70 and Leu91 では Gln70(His70) and/or Met91 よりも高率で

あり単変量解析で有意差を認めた(P=0.004)。8週(P=0.035),12週(P=0.039)でRNA陰性化する頻度は、rs8099917のTT型ではnon-TT型よりも高率であり単変量解析で有意差を認めた。多変量解析でCore aa70/91置換(Arg70 and/or Leu91)は24時間で3log以上RNA量の低下(P=0.015)に寄与する独立要因であり、rs8099917(TT型)は12週のRNA陰性化(P=0.042)に寄与する独立要因であった。更に、TVR投与量別にウイルス動態を検討した結果、2,250mg/日投与群と1,500mg/日投与群との間で12週までのウイルス動態に有意差を認めなかった。

[検討3]TVR耐性出現例に対するPEG-IFN/RBV標準投与の治療成績は、SVR 40%、NVR 20%で通常の治療成績が得られた。

D. 考察

PEG-IFN/RBV/TVR 3剤併用療法における治療効果予測因子に関する詳細な検討はこれまで行われていなかった。今回の結果から、3剤併用療法でも*IL28B*遺伝子多型とCore aa70置換が治療効果予測因子として重要であった。特に、難治が予測される前治療無効例こそCore aa70を測定することが有用であることが確認された。

3剤併用療法においてCore置換は24時間以内、*IL28B*遺伝子多型はより遅い時期のウイルス動態に関与することも確認された。この様に、2つの要因がウイルス動態の異なる経時ポイントに影響する可能性を考えると、これら要因の組み合わせで治療前効果予測を行うことの重要性を裏付ける成績であると言える。

TVR投与量に関しては、2,250mg/日投与群と1,500mg/日投与群との間で12週までのウイルス動態に有意差を認めないことが確認された。これは貧血で脱落が懸念される症例には安全性の観点からTVRを減量して開始することも一つの選択肢になり得ることを示唆している。今後はTVR減量開始例の最終的なSVR率についても検討していく必要が有る。

今回、TVR耐性出現例でも従来のIFNを軸としたPEG-IFN/RBV標準治療を行うことで通常の治療成績が得られることが確認された。これは将来懸念されるTVRを含む内服剤由来の耐性ウイルス出現例に対する治療方針を検討していく上で重要な成績であるといえる。

E. 結論

PEG-IFN/RBV/TVR 3剤併用療法の治療効果予測因子は*IL28B*遺伝子多型とCore aa70置換が重要であった。3剤併用療法で前治療再燃例は克服される傾向にあるが、難治が予測される前治療無効例ではCore aa70を測定することが有用であった。更に、3剤併用療

法においてCore置換は24時間以内、*IL28B*遺伝子多型はより遅い時期のウイルス動態に関与することが確認された。

F. 健康危険情報

今回の研究内容については特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H. 2010. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 52:421-429.

2) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. 2010. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin. *J Med Virol* 82:575-582.

3) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H. 2010. Amino acid substitution in HCV core region and genetic variation near *IL28B* gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin. *Intervirology* (in press).

2. 学会発表

1) Akuta N. Amino acid substitutions in HCV core region of genotype 1b are the important viral predictors of treatment resistance and hepatocarcinogenesis. 7th APASL Single Topic Conference "Hepatitis C Virus". Chiba, Japan, 2010.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究
研究分担報告書

C型肝硬変症例に脾摘が与える免疫学的解析：主にCD4陽性T細胞について

研究分担者 野村秀幸 国家公務員共済組合連合会 新小倉病院 診療部長

研究要旨：肝硬変症例へのIFN治療において血小板減少の改善のため脾摘を行う。脾臓自体が免疫を制御する臓器であるため、脾摘による免疫能を正確に把握することが必要である。昨年は肝硬変症例においてはPD-1が有意に発現亢進していることを指摘した。今回は、PD-1のリガンドであるPD-L1とPD-L2の発現を、肝硬変症例と対照の末梢と脾臓で確認した。フローサイトメトリーの結果では肝硬変においては対照に比べて、脾臓および末梢で有意にPD-L1、PD-L2陽性率が亢進していた。免疫組織染色では、肝硬変においては対照に比べて、脾臓でPD-L2陽性率のみが有意に亢進していた。脾臓摘出は細胞性免疫を回復させる効果を認めるため、HCV排除のためのIFN療法の支持療法となる可能性がある。

共同研究者
下田慎治 九州大学医学部修復内科学

A. 研究目的

九州大学ではC型肝硬変、あるいはC型肝硬変による移植後のIFN施行において、十分な血小板数を確保するため、脾臓摘出術（脾摘）を施行している。血小板数確保のためには脾摘は必要条件であることが多いが、脾臓自体が免疫を制御する臓器であることから、肝硬変脾臓が関与する免疫能を正確に把握しておくことが望ましい。そこで我々はまず肝硬変と、事故や二次リンパ節隔清目的での脾臓摘出症例を対照として、脾臓におけるCD4陽性T細胞の免疫能について明らかにすることとした。その結果、対照と比較して肝硬変症例では、末梢ならびに脾臓CD4陽性T細胞において、細胞増殖能が低下しており、IL-10の産生は保たれるもののIFN- γ の産生が有意に低下していた。対照と比較して肝硬変症例では、末梢ならびに脾臓において、PD-1が有意に発現亢進していた。肝硬変症例では脾摘後にはCD4陽性T細胞のTh1応答性が回復し、その一部はPD1発現低下を介している可能性が示された。そこで今年度はPD-1のリガンドであるPD-L1とPD-L2の発現を、肝硬変症例と対照の末梢と脾臓で確認することとした。

B. 研究方法

C型肝硬変15例と対照脾臓摘出症例7例の末梢血ならびに摘出脾臓を機械的に細切後、密度勾配法で単核球分画を採取した。単核球は抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体で染色後、各々の陽性細胞をフローサイトメトリーで検討した。

また摘出脾臓は抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体を用いて免疫染色で陽性細胞を確認した。

インフォームドコンセント

今研究開始前に、九州大学病院の倫理委員会の承認を得た。患者へは、登録時に今研究について十分に説明し、承諾を得た。

C. 研究結果

フローサイトメトリーの結果では、肝硬変末梢でのPD-L1陽性細胞(1.0±0.4%)は対照末梢でのPD-L1陽性細胞(0.6±0.3%)に比べて有意に増加していた(p<0.05)。肝硬変脾臓においてもPD-L1陽性細胞(2.2±0.8%)は対照末梢でのPD-L1陽性細胞(1.2±0.6%)に比べて有意に増加していた(p<0.05)。末梢と脾臓でPD-L1陽性率を検討した結果、肝硬変においては脾臓において末梢と比較して有意にPD-L1陽性率が亢進していた(p<0.001)。PD-L2についても同様の結果であった。すなわち肝硬変末梢でのPD-L2陽性細胞(0.8±0.3%)は対照末梢でのPD-L2陽性細胞(0.5±0.2%)に比べて有意に増加していた(p<0.05)。肝硬変脾臓においてもPD-L2陽性細胞(1.4±0.6%)は対照末梢でのPD-L2陽性細胞(0.9±0.3%)に比べて有意に増加していた(p<0.05)。末梢と脾臓でPD-L2陽性率を検討した結果、肝硬変においては脾臓において末梢と比較して有意にPD-L2陽性率が亢進していた(p<0.001)。次に抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体を用いて免疫染色で陽性細胞を確認した。この陽性率をスコア化（陽性なし：0、弱陽性：1、強陽性：2）してまとめた結果は、昨年までの結果と同様に免疫染色を用いても肝硬変脾臓でのPD-1陽性率(1.8±0.1)は対照脾臓でのPD-1陽性率(1.2±0.3)よりも有意

に亢進していた ($p < 0.05$)。そのリガンドである PD-L1 の陽性率は肝硬変 (1.6 ± 0.2) と脾臓 (1.6 ± 0.2) で有意差を認めなかったが、PD-1 のもうひとつのリガンドである PD-L2 は、肝硬変脾臓での陽性率 (1.8 ± 0.2) は対照脾臓での陽性率 (0.7 ± 0.2) よりも有意に亢進していた ($p < 0.01$)。

D. 考察

肝硬変において、対照と比較して、単核球での細胞増殖能が低下して、IL-10 産生は保たれるにもかかわらず IFN-g の産生が低下する機序として、単核球での PD-1 発現が亢進していることが原因のひとつと考えられた。PD-1 のリガンドである PD-L2 の発現が脾臓で有意に亢進していることから、脾臓摘出後に単核球での細胞増殖能やサイトカイン産生能が回復する機序として、脾臓摘出によって PD-L2 からの PD-1 刺激がなくなることが原因のひとつと考えられた。

E. 結論

脾臓摘出は細胞性免疫を回復させる効果を認めるため、HCV 排除のための IFN 療法の支持療法となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kainuma M, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Shimono J, Shimoda S, Hayashi J. Pegylated interferon α -2b plus ribavirin for older patients with chronic hepatitis C. World J Gastroenterol. 16: 4400-9, 2010.

2. 学会発表

1) M. Nakamuta, R. Yada, A. Taketomi, M. Yada, T. Yoshimoto, N. Fukushima, K. Fukuizumi, Y. Maehara, H. Nomura, M. Enjoji ALTERATION IN LIPID AND GLUCOSE (INSULIN SIGNALING PATHWAY) METABOLISM-RELATED GENE EXPRESSION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA HAS IMPLICATIONS FOR TREATMENT USING LIPID MODULATORS. EASL (Vienna) 2010.
2) M. Nakamuta, T. Yoshimoto, S. Harada, T. Ohashi, N. Fukushima, K. Fukuizumi, T. Fujino, H. Nishi, T. Mizutani, N. Harada, H. Nomura, M. Enjoji. LIPID MODULATORS (STATINS AND EICOSAPENTAENOIC ACID) ACCELERATE THE DECLINE OF HCV VIRUS LOAD DURING TREATMENT WITH PEG-INTERFERON AND RIBAVIRIN.

EASL (Vienna) 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
研究分担報告書

Membrane Yeast Two-Hybrid 法を用いた HCV NS5A 蛋白に
結合する宿主因子の探索

研究分担者： 林 紀夫
独立行政法人労働者健康福祉機構関西労災病院・病院長

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）のNS5A蛋白はウイルス増殖にとって非常に重要な因子であるとともに、それが発現する細胞では増殖や細胞死などに多彩な影響を及ぼすとされる。今までにNS5Aと結合する宿主側の因子を探索する手法として、主として yeast two-hybrid 法が用いられてきたが、この手法は核内での2種類の蛋白の相互作用を検出するものである。NS5Aは小胞体（ER）膜に主に局在する蛋白であり、今回我々はER膜上での蛋白の相互作用を検出する membrane yeast-two hybrid 法を用いてライブラリーのスクリーニングを行い、NS5Aと結合する蛋白の同定を試みた。その結果、SERP1/RAMP4、TMEM134、SORBS2/ArgBP2、signal peptidase complex subunit 1、ubiquitin C、asialoglycoprotein receptor 2、HDAC6の7種類のクローンが得られた。このうちSERP1、TMEM134、SORBS2については免疫沈降法にてNS5Aとの相互作用が確認された。ERストレスに参与するとされるSERP1についてさらに検討を行い、HCVレプリコン細胞においてはその蛋白発現が低下していること、培養細胞でのSERP1の強発現はERストレスを軽減させることが認められた。HCV感染によりERストレスが誘導されることはよく知られており、NS5Aとの会合によっておこるSERP1の発現低下がERストレスに参与する可能性が示唆された。

共同研究者

竹原徹郎 大阪大学消化器内科学 准教授
石田 永 大阪大学消化器内科学 助教

もしくは Golgi 装置の膜上に局在すると考えられており、HCV のゲノム RNA 複製やウイルス粒子形成などウイルスの生活環を形成するにおいて、重要な役割を果たしている。その中で NS5A 蛋白もまた HCV の増殖過程には必須の蛋白で、今までにもウイルス増殖における役割や宿主細胞に与え

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の non-structural (NS) 蛋白は小胞体（ER）

る影響について多くの報告がある。特に ISDR 近傍領域とインターフェロン (IFN) 誘導遺伝子である PKR の相互作用によりそのシグナルが制御されるという報告がなされ、また臨床領域においても同部位のアミノ酸変異と IFN 治療反応性の間に強い相関が示されている。また最近では NS5A と結合する分子が阻害剤として作用することから、IFN 治療の併用薬として本邦でも治験が開始されている。以上のごとく、NS5A は HCV の増殖に非常に重要なウイルス蛋白の一つであり、細胞内で機能する上で多くの宿主因子との相互作用が必要であることが知られている。一方で、NS5A が宿主因子と結合することにより増殖や細胞死など様々な細胞機能修飾に関与することも明らかとなっている。

宿主因子と結合する蛋白を探索する手法としては、今まで主として酵母を用いた yeast two-hybrid 法が用いられてきた。この手法により検出される圈蛋白とそれに結合する標的蛋白との会合の場は核内にある。一方 NS5A の局在は ER が主であるため、本来の所在である ER で結合する蛋白の解析ができていないかは疑問である。そこで今回我々は、ER 膜上での 2 種の蛋白の結合を検出する membrane yeast-two hybrid (memY2H) 法を用いて、NS5A と結合する蛋白を探索することとした。

B. 研究方法

HCV NS5A 領域の cDNA を組み込んだプラスミドを作成し、NS5A を恒常的に発現する酵母株を作成した。さらにヒト肝由来の cDNA ライブラリープラスミドをその酵母に導入した。NS5A と cDNA 由来の蛋白が

ER 膜上で結合した場合、そのクローンは His、Ade 合成能を獲得することとなり、両者の欠損培地上での生育が可能となる。こうして得られた酵母のクローンよりプラスミドを回収し、再度酵母に導入して同様の形質が得られることを確認の後、シーケンスにて得られた遺伝子を解析した。

同定された遺伝子については、タグ付き発現ベクターを作成、肝癌細胞株 Huh7 に導入し、免疫沈降法を用いて NS5A との相互作用を確認した。また強発現プラスミドを細胞に導入し、その影響を解析することとした。

C. 研究成果

memY2H 法を用いて cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、His、Ade 欠損培地で生育する 100 個のコロニーよりプラスミドを回収した。各々を再び酵母に導入して擬陽性を否定し得たクローンについて、次にシーケンスを行ってプラスミドに組み込まれた遺伝子の同定を行った。重複して検出されたものもあり、7 クローンが最終的に陽性と判定された。その内訳は、SERP1、TMEM134、SORBS2、signal peptidase complex subunit 1、ubiquitin C、asialoglycoprotein receptor 2、HDAC6 であった。そのうち、SERP1、TMEM134、SORBS2 について、免疫沈降法を用い NS5A との相互作用について検討を行ったところ、ウエスタンブロットにていずれも特異的なバンドが検出された。

次に、このうち SERP1 についてさらに検討を進めることとした。以前の報告より、SERP1 は ER ストレスにより誘導され、ER ストレスを軽減する働きのある蛋白である

ことが知られている。また、HCV の感染、あるいは HCV 蛋白の発現により ER ストレスが誘導されることが多施設より報告されている。そこで、HCV レプリコン細胞 (Huh-repSI)、および IFN により細胞内のレプリコン RNA を除去した cured 細胞 (Huh-repSIc) に SERP1 を強発現させ、ER ストレスのマーカーのひとつとなっている PERK のリン酸化をウエスタンブロットで解析した。SERP1 の発現により、Huh-repSIc では PERK のリン酸化レベルは減弱を認めており、SERP1 には ER ストレスを軽減する作用があることが確認された。一方、Huh-repSI の PERK のリン酸化レベルは cured 細胞と比べて大きく減弱しており、HCV は PERK の活性化を抑制するメカニズムを有することが示唆された。

D. 考察と結論

HCV NS5A 蛋白は、HCV 増殖に必須であるとともに細胞機能にも多彩な影響を及ぼす multi-functional な蛋白であるが、今回我々は memY2H 法を用いて ER 膜上で NS5A に結合しうる宿主蛋白の同定を試みた。その結果、最終的に上述の 7 種類の遺伝子が positive clone として同定された。そのうち、SERP1、signal peptidase complex subunit 1 は ER 局在が報告されている。SORBS2 は stress fiber や lipid raft に局在するとされるが、HCV の replication complex もまた lipid raft との関連が指摘されており、この部位で会合している可能性が示唆される。asialoglycoprotein receptor 2 は細胞膜に局在し、TMEM134 は膜蛋白ではあるが詳細は不明である。SERP1、TMEM134、SORBS2 については細胞内で

NS5A との相互作用も確認され、NS5A の果たす役割に関与しているのではないかと推測された。

この中で、本検討では SERP1 の解析をさらに行うこととした。コントロールである cured 細胞に比し、HCV レプリコン細胞で SERP1 の mRNA 量に有意差はないものの、その蛋白発現は大きく減弱することから、SERP1 が NS5A と会合することで degradation が誘導されているのではないかと考えられる。SERP1 の発現は ER ストレスにより誘導され、また ER ストレスを軽減する働きがあることが知られている。一方で、HCV 感染時に ER ストレスが誘導されるとの報告も数多くある。今回の結果からは、HCV 感染細胞やレプリコン細胞では NS5A と SERP1 との相互作用により SERP1 の蛋白レベルが低下をきたし、それが最終的に ER ストレスを誘導する可能性が示唆された。HCV による ER ストレス誘導の機序は不明な点も多く、その解明の一助になりうるものと思われる。

以上の通り、memY2H 法を用いて、ER を標的として、NS5A に結合しうる蛋白が複数同定された。これらはいずれも新規のものであり、memY2H 法は ER 蛋白の解析には有用な手法であり、他の HCV 蛋白についても試みる価値があるのではないかと思われた。検出されたものの中に ER ストレスに関与するものもあり、これら蛋白の NS5A による細胞機能修飾への影響について、今後さらなる検討が必要と考えられた。

E. 研究発表：なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：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）

研究分担報告書

高齢者 C 型肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin 併用療法

研究分担者 平松 直樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 講師

研究要旨： Peg-IFN/Rib 併用療法を施行された C 型肝炎 3064 例 (genotype1 型 (IH) 1435 例、genotype1 型高ウイルス量以外 (non-IH) 498 例) を対象として検討した。IH 群の副作用中止率は全症例で 16%であったが、65-69 歳 25%、70 歳以上 32%と高く、non-IH 群でも 65-69 歳 16%、70 歳以上 26%と、高齢になるにつれて中止率が増加した。治療完遂例における著効率は、IH 群 (48 週投与) で 60 歳未満 52%、60-64 歳 47%、65-69 歳 37%、70 歳以上 31%と高齢になるにつれて低下したが、EVR (12 週迄の HCV-RNA 陰性化) 例では、60 歳未満の 81% (260/323) に比し、65 歳以上の高齢者においても 79% (48/61) と、著効率の低下を認めなかった。また、65 歳以上の LVR (13~24 週の HCV-RNA 陰性化) 例の著効率は、48 週投与で 17% (4/23)、72 週投与で 53% (19/36) と 72 週投与により著効率は改善した ($p < 0.01$)。一方、non-IH 群 (24 週投与) では、60 歳未満 83%、60-64 歳 77%、65-69 歳 83%、70 歳以上 80%と高齢者においても比較的良好な著効率が得られた。【結論】 高齢者 C 型肝炎に対する Peg-IFN/Rib 併用療法において、IH 群でも EVR が得られれば治療効果は非高齢者と遜色なく、また LVR 例では長期投与によって著効率が向上した。Non-IH 群では高齢者でも良好な著効率が得られ、良い適応と考えられた。

A. 研究目的

高齢化社会が進むにつれて、高齢者 C 型肝炎患者に対する抗ウイルス療法の是非が問題となっている。本研究では、高齢者 C 型肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin (Rib) 併用療法の有用性について検討した。

B. 研究方法

大阪大学ならびに関連施設において Peg-IFN/Rib 併用療法を開始登録された C 型肝炎 3064 例のうち、genotype1 型高ウイルス量 (IH) 1435 例 (65-69 歳/70 歳以上=169/46、男性/女性=770/663)、genotype1 型高ウイルス量以外 (non-IH) 498 例 (65-69 歳/70 歳以上:37/15、M/F=252/246) を対象とした。

C. 研究結果

IH 群の副作用中止率は全症例 16%であったが、65-69 歳 25%、70 歳以上 32%と高く、non-IH 群でも 65-69 歳 16%、70 歳以上 26%と高齢になるにつれて中止率が増加し、70 歳以上では貧血による中止が約 4 割を占めた。一方、治療完遂例における著効率は、IH 群 (48 週投与) で 60 歳未満 52%、60-64 歳 47%、65-69 歳 37%、70 歳以上 31%と高齢になるにつれて低下したが、EVR (12 週迄の HCV-RNA 陰性化) 例では、60 歳未満の 81% (260/323) に比し、65 歳以上の高齢者においても 79% (48/61) と、著効率の低下を認めなかった (図 1)。また、65 歳以上の LVR (13~24 週の HCV-RNA 陰性化) 例の著効率は 48 週投与では 17% (4/23) と低率であったが、

72週投与では53% (19/36)と、長期投与により著効率は改善した ($p < 0.01$)。一方、治療早期の HCV-RNA 減少率と著効率には密接な関連があり、65才以上の症例における治療開始4週時点での HCV-RNA 減少率別の著効率(48週投与)は、 $<1\log/1-2\log/2\log \leq =0\%$ (0/32)/13% (2/16)/60% (28/47)、8週時点では、 $<1\log/1-2\log/2\log \leq =0\%$ (0/22)/0% (2/13)/58% (42/73)と、治療開始4週時点で1log、8週時点で2log未満の HCV-RNA 減少率の症例からは、48週投与では1例も著効が得られなかった。

non-IH群(24週投与)では、60歳未満83%、60-64歳77%、65-69歳83%、70歳以上80%と高齢者においても比較的良好な著効率が得られた。

D. 考察

高齢者C型肝炎に対するPeg-IFN/Rib併用療法において、IH群では副作用中止率が高く、著効率も低かったが、EVRが得られれば治療効果は非高齢者と遜色なく、またLVR例では長期投与によって著効率が向上した。逆に、48週投与で著効を得るためには、治療開始4週時点で1log、8週時点で2log以上のHCV-RNA減少が必要であり、治療への反応性が不良な症例では、副作用出現の程度いかんにより中止を考慮する必要があると考えられた。また、Non-IH群においても高齢者の副作用中止率は高かったが、治療完遂例では良好な著効率が得られ、Peg-IFN/Rib併用療法の良い適応と考えられた。

E. 結論

高齢者C型肝炎に対するPeg-IFN/Rib併用療法は、治療への反応性によって中止/継続を

考慮することにより、より有用な治療法となりうることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表:

1) Sakamori R, Takehara T, Tatsumi T, Shigekawa M, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo. *J Gastroenterol.* 2010;45(2):244-8.

2) Miyagi T, Takehara T, Nishio K, Shimizu S, Kohga K, Li W, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. Altered interferon-alpha-signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2010 ;53(3):424-430.

2. 学会発表:

1) 宋 昌浩、平松直樹、井上裕子、他 “C型慢性肝疾患におけるVITQ (Virtual Touch Tissue Quantification)を用いた肝線維化の非侵襲的評価” 一般演題 第96回日本消化器病学会総会 2010

2) 平松直樹、竹原徹郎、林 紀夫. “難治性C型肝炎に対するPeg-IFN/Ribavirin併用療法の個別化治療による治療効果改善の可能性” シンポジウム「C型肝炎における抗ウイルス療法の近未来」第46回日本肝臓学会総会 2010

3) 井上裕子、平松直樹、小瀬嗣子、他. “難治性C型肝炎に対するPeg-IFN/Ribavirin併用療法におけるHCV Core領域アミノ酸変異が治療後再燃におよぼす影響について” 一般演題 第46回日本肝臓学会総会

2010

4) 小瀬嗣子、平松直樹、薬師神崇行、他.

“Real time PCR 法を用いた HCV RNA 測定系における C 型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 併用療法の治療効果予測” 一般演題 第 46 回日本肝臓学会総会 2010

5) 小瀬嗣子、平松直樹、薬師神崇行、他.

“Peg-IFN/Ribavirin 併用療法非著効例に対する再治療について—多施設 (OLF) 共同研究—” 一般演題 第 46 回日本肝臓学会総会 2010

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

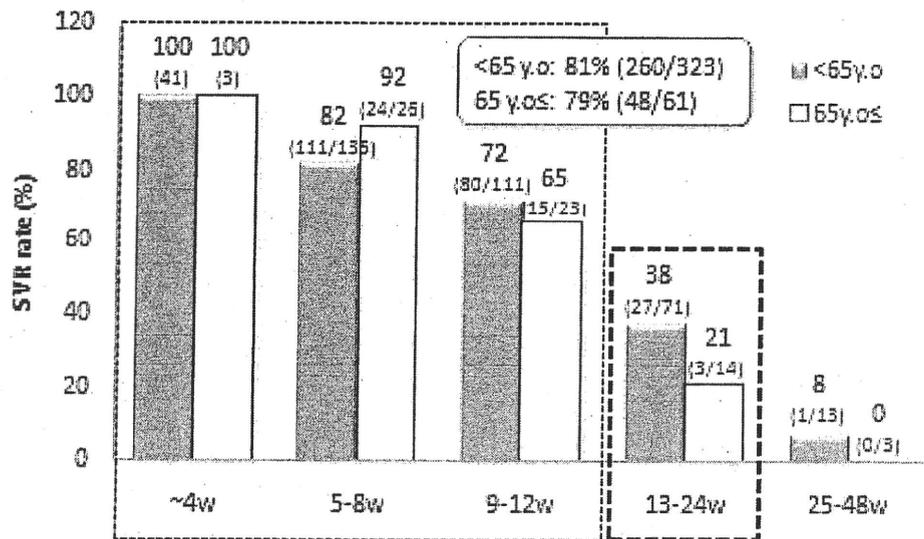


図1. Peg IFN/RBW併用療法におけるHCV-RNA陰性化時期別著効率
 (標準投与量で開始した治療完遂例)

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）
研究分担報告書

C型肝炎・血小板低値例に対するインターフェロン治療のありかた

研究分担者 三田 英治 国立病院機構大阪医療センター 消化器科科長

研究要旨 C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リ
バビリン併用療法において血小板低値例の動向を検討し、治
療のありかたを考察した。その結果、血小板数が12万/mm³
未満の症例ではペグインターフェロンが減量されることの多
いことが示された。また、インターフェロン治療目的で摘脾
する場合、血小板数は平均7.2万/mm³から14.1万/mm³ま
で増加し、確実に治療を導入する対策と考えられた。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロ
ン(interferon、以下IFN)治療は、こ
の10年間で大きく進化した。HCV
genotype 1型・高ウイルス量のいわゆる
難治例に対しても、標準治療であるペグ
インターフェロン(pegylated IFN、以
下Peg-IFN)・リバビリン(ribavirin、
以下RBV)併用療法での著効(sustained
virological response、以下SVR)率は
50%近くまで改善した。今後もプロテア
ーゼ阻害剤やNS5A阻害剤によって
SVR率はさらに向上するものとする考
えるが、当面はPeg-IFN・RBVとの3剤
併用で使用される。したがって、血小
板数が低値の症例に対してはPeg-IFN
のadherenceが低いために再燃や無効
になることが予想され、新薬上市後の
課題と言える。

血小板数低値の問題はgenotype 2型

もしくは低ウイルス量でも同じである。
IFN/Peg-IFNのadherenceさえ確保で
きれば90%近いSVR率が期待できるも
の、IFN/Peg-IFNの低いadherence
が反応不良の原因になるケースがある。

この血小板低値に対する対策としての
摘脾術のもつ意義を検証した。

B. 研究方法

(1) 治療前の血小板数からみたPeg-IFN
の実際投与量

当科にてPeg-IFN・RBV併用療法を
導入したHCV genotype 1型・高ウイル
ス量のC型慢性肝炎171例を対象に、治
療前の血小板数とPeg-IFNの1~24回
目の実際投与量/推奨投与量比を検討し
た。

(2) 摘脾による血小板数増加効果

当科では血小板数低値例に対し、摘脾
術もしくは部分脾動脈塞栓術(partial

splenic arterio-embolization、以下PSE)を用いて血小板増加をはかり IFN 治療を導入している。しかし、血小板数による摘脾および PSE 適応の明確な基準はいまだ示されていない。今後これらの指標をつくるには、症例の積み重ねが重要と考える。今回は当院で脾臓を摘出した症例の血小板増加効果を検討した。

(3) 倫理面への配慮
特になし

C. 研究結果

(1) 治療前の血小板数からみた Peg-IFN の実際投与量

171 例を血小板数 (/mm³) によって、

(1) 26 万以上、(2) 22 万以上 26 万未満、(3) 20 万以上 22 万未満、(4) 18 万以上 20 万未満、(5) 16 万以上 18 万未満、(6) 14 万以上 16 万未満、(7) 13 万以上 14 万未満、(8) 12 万以上 13 万未満、(9) 11 万以上 12 万未満、(10) 10 万以上 11 万未満、(11) 10 万未満、の 11 グループに層別化した。

その結果 (図 1)、血小板数 (/mm³) が 12 万以上ではほぼ推奨量の Peg-IFN 投与が可能であった。しかし、11 万以上 12 万未満、10 万以上 11 万未満では Peg-IFN を減量していることが示された。そして 10 万未満では、さらに Peg-IFN の減量もしくは治療中止がされていた。

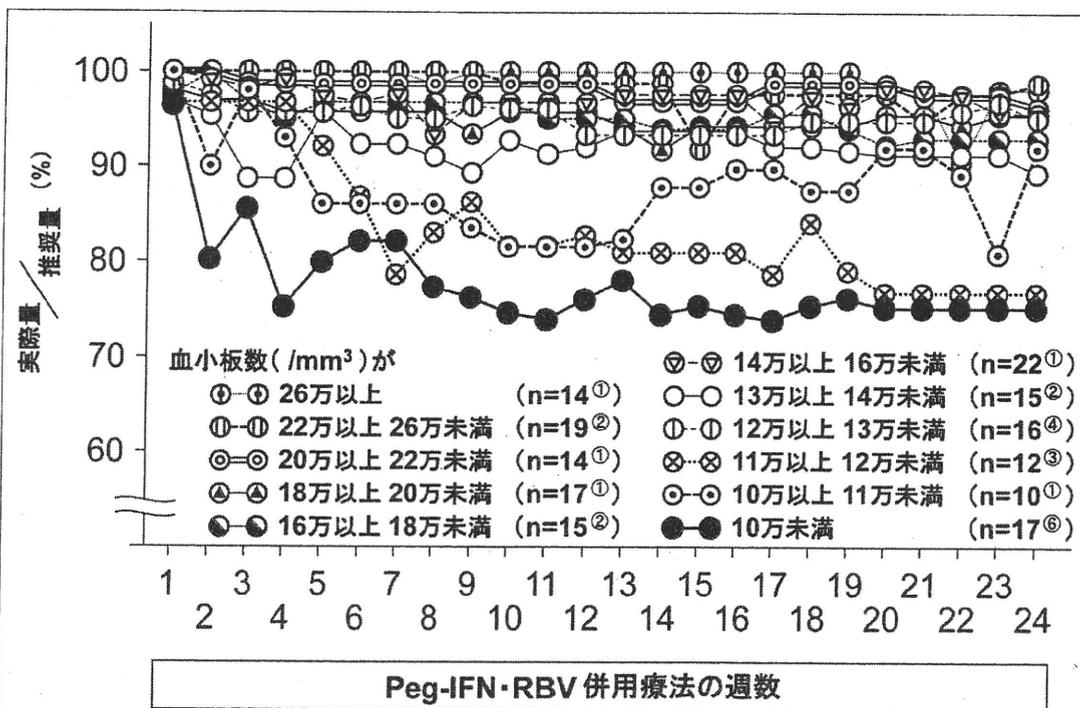


図 1. 治療開始前の血小板数と Peg-IFN の実際投与量

図中の症例数の右肩文字として○で囲った数字は、当該階層において治療開始 24 週目までに治療を中止した症例数を示している。血小板数が 12 万 /mm³ 以上では精神症状などでの中止が多かったが、12 万 /mm³ 未満では、adherence が低いため治療効果が不十分で中止に至る症例が多数を占めた。

(2) 摘脾による血小板数増加効果

IFN 治療を目的に脾臓摘出を行った今回の解析対象は 21 例である。胃切除後の 1 例は開腹手術であったが、それ以外の 20 例は腹腔鏡下での摘脾術をめざした。うち 2 例は hand-assisted であった。

摘脾前の血小板数 ($/\text{mm}^3$) は 7.2 万 \pm 2.5 万であったのに対し、IFN 治療前の血小板数は 14.1 万 \pm 4.0 万であり (図 2)、IFN 治療導入の点からは確実な対応策と考えられた。

図 2. 摘脾前後の血小板数の比較

摘脾後の血小板数は最高値ではなく、治療導入前の値を示す。

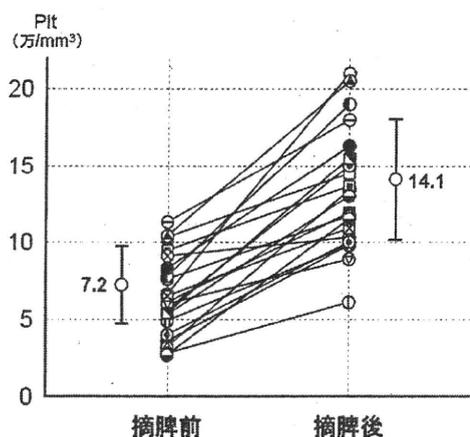
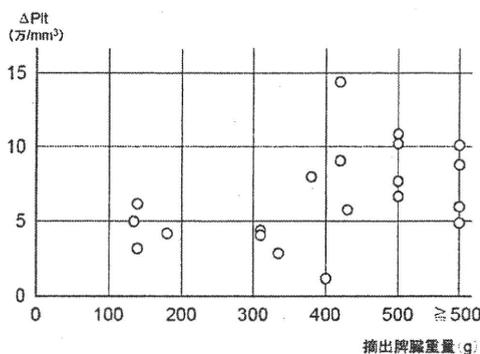


図 3. 摘出脾臓重量と血小板数増加幅



摘出脾臓重量と血小板数の増加と正の相関を認めたが (図 3)、一部増加幅が予想を下回る症例が認められ、正確な予測指標の確立が望まれた。

D. 考察

C 型慢性肝炎に対する IFN 治療導入目的で摘脾する場合、摘脾適応基準の血小板数に関する知見は少ない。多くの施設では、血小板数が 10 万 $/\text{mm}^3$ 未満で導入されている。しかし、今回の検討から血小板数が 12 万 $/\text{mm}^3$ 未満では Peg-IFN の adherence が低下しているケースが多いことが示され、摘脾もしくは PSE の対象となりうる可能性が示唆された。

実際、摘脾症例 21 例の検討では、血小板数が 10 万 $/\text{mm}^3$ 以上でも初回治療における血小板数減少の著しかった症例で、摘脾が実施した。ただ前回の IFN 治療で再燃した症例が対象となっており、患者背景を含めた総合判断が必要とされた。摘出脾臓重量と血小板数の増加幅とは正の相関を認めたが、若干例に期待を下回ることが観察され、今後の課題と思われる。

E. 結論

摘脾によって血小板増加をはかり IFN 治療を導入する方策は、血小板数低値の C 型慢性肝炎例においておおむね確実な手法であった。

F. 研究発表

- 1) Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Fukuda

- K, Mita E, Haruna Y, Inoue A, Imai Y, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N.
- Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin.
- J Med Virol. 2011;83:419-427.
- 2) Ikura Y, Mita E, Nakamori S.
- Hepatocellular carcinomas can develop in simple fatty livers in the setting of oxidative stress.
- Pathology. 2011;43:167-168.
- 3) Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Mochizuki K, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, and Hayashi N.
- Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy.
- J Hepatol. in press.
- 4) Hasegawa H, Fujitani K, Kurokawa Y, Hirao M, Nakazuru S, Mita E, Tsujinaka T.
- Effect of S-1 adjuvant chemotherapy on survival following recurrence and efficacy of first-line treatment in recurrent gastric cancer.
- Chemotherapy. 2010;56:436-443.
- 5) Migita K, Watanabe Y, Jiuchi Y, Nakamura Y, Saito A, Yagura M, Morimoto H, Shimada M, Mita E, Hijioka T, Yamashita H, Takezaki E, Muro T, Sakai H, Nakamura M, Abiru S, Yano K, Komori A, Yatsushashi H, Nakamura M, Ishibashi H.
- Evaluation of risk factors for development of cirrhosis in autoimmune hepatitis: Japanese NHO-AIH prospective study.
- J Gastroenterol 2011;46 Suppl 1:56-62.
- 6) Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Nakazuru S, Mita E, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N.
- Hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon- α and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection.
- Hepatol Res. 2010;41:30-38.
- 7) Nakazuru S, Yoshio T, Suemura S, Itoh M, Araki M, Yoshioka C, Ohta M, Sueyoshi Y, Ohta T, Hasegawa H, Morita K, Toyama T, Kuzushita N, Kodama Y, Mano M, Mita E.
- Poorly differentiated endocrine carcinoma of the pancreas