

Hashimoto Y, <u>Suzuki F</u> , Hirakawa M, Kawamura Y, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H.	Clinical and virological effects of long-term (over 5 years) lamivudine therapy.	J Med Virol	82	684-691	2010
Suzuki Y, <u>Suzuki F</u> , Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Miyakawa Y, Kumada H.	Association of HLA-DR14 with Treatment Response in Japanese Patients with Autoimmune Hepatitis.	Dig Dis Sci	55	2070-2076	2010
Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K.	HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy.	Gut.	in press	in press	2010
瀬崎ひとみ, <u>鈴木文孝</u> , 芥田憲夫, 平川美晴, 川村祐介, 八辻寛美, 保坂哲也, 小林正宏, 鈴木義之, 斎藤聡, 荒瀬康司, 池田健次, 熊田博光	C型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリビリン併用療法におけるNS3-4A プロテアーゼ阻害剤(Telaprevir)併用12週間治療のウイルス学的効の検討.	肝臓	51(7)	394-396	2010
八辻寛美, <u>鈴木文孝</u> , 平川美晴, 川村祐介, 瀬崎ひとみ, 保坂哲也, 芥田憲夫, 小林正宏, 鈴木義之, 斎藤聡, 荒瀬康司, 池田健次, 岩崎里美, 峰田理恵, 綿引祥予, 小林万利子, 熊田博光	核酸アナログ未使用のB型慢性肝炎症例へのエンテカビル治療中にrtA181Tウイルスが増殖した一症例	肝臓	51(4)	196-198	2010

<p>小林万利子、<u>鈴木文孝</u>、芥田憲夫、鈴木義之、瀬崎ひとみ、八辻寛美、保坂哲也、小林正宏、川村祐介、平川美晴、荒瀬康司、池田健次、峰田理恵、岩崎里美、綿引祥子、中村祐輔、茶山一彰、熊田博光.</p>	<p>IL28BとHCV Core aa70 置換との関連</p>	<p>肝臓</p>	<p>51(6)</p>	<p>322-323</p>	<p>2010</p>
--	-----------------------------------	-----------	--------------	----------------	-------------

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Nakagawa M.</u> Sakamoto N, et al.	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	<i>J Gastroentero</i>	45	656-65	2010
Karakama Y <u>Nakagawa M.</u> Sakamoto N, et al.	Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase.	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	54	3179-3186	2010
Mishima K <u>Nakagawa M.</u> Sakamoto N, Enomoto N, et al.	Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants.	Virology	405	361-369	2010
Suda G <u>Nakagawa M.</u> Sakamoto N, et al.	IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones.	Virology	407	80-90	2010
Kurosaki M <u>Nakagawa M.</u> Sakamoto N, Enomoto N, et al.	Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors.	J Hepatol	In press		2011
Sakamoto N, <u>Nakagawa M.</u> , et al.	ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-a and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C	Hepatology Res	40	1063-1071	2010
Yamamoto M, <u>Nakagawa M.</u> Sakamoto N, et al.	Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture.	Hepatology Res	In press		2011

<u>Nakagawa M,</u> Sakamoto N,et al.	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	In press		2011
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	60巻5号	849-856	2011
中川美奈、坂本直哉、渡辺守	Cyclophilin inhibitors	肝胆膵	In press	In press	In press
坂本直哉、 <u>中川美奈</u> 、渡辺守	肝疾患における血液生化学検査, IL28B	肝胆膵	60巻4号	657-660	2010

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chang J-H, Kato N, et al.	Double-stranded-RNA activated protein kinase inhibits hepatitis C virus replication but may be not essential in interferon treatment.	Liver Int	30	311-318	2010
加藤直也, 他.	今後有望なウイルス肝炎の新規治療薬.	medicina	47 巻 3 号	2010-2013	2010
加藤直也, 他.	C 型肝炎の近未来治療	Medical Science Digest	36 巻 8/号	916-919	2010

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻	ページ	出版年
1) Mori K, (加藤)	Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other hepatic cell lines.	Hepatology Research	40	1248-1253	2010
2) Ikeda F, (加藤)	Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- α in vitro.	Liver International	30	1324-1331	2010
3) Nozaki A, (加藤)	Hydroxyurea as an inhibitor of hepatitis C virus RNA replication.	Archives of Virology	155	601-605	2010
4) Nozaki A, (加藤)	Hydroxyurea Suppresses Hepatitis C Virus Replication in Human: A Phase I Trial of Oral Hydroxyurea in Chronic Hepatitis C Patients. Antiviral Therapy.	Antiviral Therapy	15	1179-1183	2010
5) Nakamura N, (加藤)	An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus.	World Journal of Gastroenterology	16	184-192	2010
6) Shigoka M, (加藤)	Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development.	Pathology International	60	351-357	2010

7)Yu S, (加藤)	Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3.	Journal of General Virology	91	2080-2090	2010
8)Tanaka T, (加藤)	Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure.	Journal of Bioscience and Bioengineering	110	374-376	2010
9)Oshiumi H, (加藤)	Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- β induction.	PLoS One	5	e14258	2010
10)Ariumi Y, (加藤)	The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. 劫劫	PLoS One	6	e14517	2011
11)Wen X, (加藤)	Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules.	PLoS One	6	e15967	2011

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kanda T, Jeong SH, Imazeki F, Fujiwara K, <u>Yokosuka O.</u>	Analysis of 5' nontranslated region of hepatitis a viral RNA genotype I from South Korea: comparison with disease severities.	PLoS One..	28巻、5号	e15139	2010
Kanda T, Imazeki F, Yonemitsu Y, Mikami S, Takada N, Nishino T, Takashi M, Tsubota A, Kato K, Sugiura N, Tawada A, Wu S, Tanaka T, Nakamoto S, Mikata R, Tada M, Chiba T, Kurihara T, Arai M, Fujiwara K, Kanai F, <u>Yokosuka O.</u>	Quantification of hepatitis C virus in patients treated with peginterferon-alfa 2a plus ribavirin treatment by COBAS TaqMan HCV test.	J Viral Hepat			2010
Fujiwara K, Yasui S, Okitsu K, Yonemitsu Y, Oda S, <u>Yokosuka O.</u>	The requirement for a sufficient period of corticosteroid treatment in combination with nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B.	J Gastroenterol	45巻、12号	1255-1262	2010

Wu S, Fukai K, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, <u>Yokosuka O.</u>	Initial Virological Response and Viral Mutation with Adefovir Dipivoxil Added to Ongoing Lamivudine Therapy in Lamivudine-Resistant Chronic Hepatitis B.	Dig Dis Sci.			2010
Wu S, Kanda T, Imazeki F, Arai M, Yonemitsu Y, Nakamoto S, Fujiwara K, Fukai K, Nomura F, <u>Yokosuka O</u>	Hepatitis B virus e antigen downregulates cytokine production in human hepatoma cell lines.	Viral Immunol.	23卷、5号	467-476	2010
Yang L, Kiyohara T, Kanda T, Imazeki F, Fujiwara K, Gauss-Müller V, Ishii K, Wakita T, <u>Yokosuka O.</u>	Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha.	Virol J.	3卷、7号	212	2010
Kanda T, Gauss-Müller V, Cordes S, Tamura R, Okitsu K, Shuang W, Nakamoto S, Fujiwara K, Imazeki F, <u>Yokosuka O.</u>	Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein.	J Viral Hepat	17卷、9号	618-623	2010
Kanda T, Imazeki F, <u>Yokosuka O.</u>	New antiviral therapies for chronic hepatitis C.	Hepatol Int.	19 卷、4 号	548-561.	2010
<u>Yokosuka O,</u> Takaguchi K, Fujioka S, Shindo M, Chayama K, Kobashi H, Hayashi N, Sato C, Kiyosawa K, Tanikawa K, Ishikawa H, Masaki N, Seriu T, Omata M.	Long-term use of entecavir in nucleoside-naïve Japanese patients with chronic hepatitis B infection.	J Hepatol.	52 卷、6 号	791-799.	2010
Imazeki F, <u>Yokosuka O,</u> Omata M.	Impact of IL-28B SNPs on control of hepatitis C virus infection: a genome-wide association study.	Expert Rev Anti Infect Ther.	8 卷、5 号	497-499	2010

Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Okitsu K, Fujiwara K, Yokosuka O.	Internal ribosomal entry-site activities of clinical isolate-derived hepatitis A virus and inhibitory effects of amantadine.	Hepatol Res.	40 卷、4 号	415-423	2010
Mukaide M, Tanaka Y, Shin-I T, Yuen MF, Kurbanov F, Yokosuka O, Sata M, Karino Y, Yamada G, Sakaguchi K, Orito E, Inoue M, Baqai S, Lai CL, Mizokami M.	Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation.	Antimicrob Agents Chemother.	54 卷、2 号	882-889	2010
Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O.	Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development.	J Hepatol.	52 卷、1 号	72-78	2010
Ito K, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Bekku D, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, Yokosuka O.	Risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection.	Scand J Gastroenterol.	45 卷、2 号	243-249	2010

Lowering HCV RNA during the first phase is essential for efficient elimination of HCV during the second phase. Decreases in HCV RNA titers within the first 24–48 h after the start of IFN would, therefore, be a dependable estimate of antiviral efficacy [12, 13].

Early viral kinetics, determined up to week 2, are believed to express the therapeutic effect of PEG-IFN. The concentration of PEG-IFN α -2b in serum peaks after 24 h, then declines gradually [14, 15]. The viral load is thus reduced by 24 h but increases in week 1 [16, 17]; with a large dose of PEG-IFN at each administration, it decreases markedly at 24 h but then increases in week 1 regardless of the dose. In the responder group, however, the viral load continues to decline each week thereafter [17].

In this study, we used new indices proposed by Nomura et al. [8]: RI-1st and RI-2nd calculated from early viral kinetics. RI-1st was defined as the coefficient derived by dividing the viral load of HCV core antigen at week 1 by that at 24 h, and the RI-2nd was defined as the coefficient derived by dividing the viral load at week 2 by that at 24 h. In the SVR group, a number of patients demonstrated no increase in the viral load at week 1. Patients with a high RI-2nd were regarded as poor responders or non-responders to PEG-IFN. The RI-2nd of those other than non-responders was below 0.7; therefore, 0.7 was adopted as the reference value for RI-2nd, and the patients were divided into 3 groups based on RI-1st and RI-2nd: the RI-A group (RI-1st \leq 1.0), the RI-B group (RI-1st $>$ 1.0 and RI-2nd $<$ 0.7) and the RI-C group (RI-1st $>$ 1.0 and RI-2nd \geq 0.7). The SVR rate of the RI-A, RI-B and RI-C groups was 71.4% (10/14), 46.2% (6/13) and 20% (2/10), respectively ($p = 0.005$ between the RI-A group and the RI-C group). RIs are also associated with the early clearance of HCV RNA that is related to SVR.

In the RI-A group 21.4% (3/14), 35.7% (5/14) and 35.7% (5/14) became HCV RNA negative by weeks 4, 8 and 12, respectively. In the RI-B group 7.7% (1/13), 15.4% (2/13), 30.8% (4/13) and 38.5% (5/13) became HCV RNA negative by weeks 4, 8, 12, and at and after week 16, respectively. In the RI-C group 6.7% (1/15) and 40.0% (6/15) became HCV RNA negative by week 12, and at and after week 16, respectively. It is believed that the simplified RI-1st and RI-2nd are evidential indices for determining the therapeutic efficacy of PEG-IFN/RBV treatment.

We have previously reported that the high degree of sequence variation in IRRDR (IRRDR \geq 6) significantly correlates with SVR, whereas the low degree of sequence variation in this region (IRRDR \leq 5) correlates with non-SVR [4]. A significant correlation between the rapid reduction of HCV core antigen titers and the degree of se-

quence variation in IRRDR has been observed. This, in particular, suggests a possible influence of IRRDR \geq 6 on HCV replication kinetics during IFN-based therapy, especially that the direct effect of IFN begins a few hours after the first dose.

In this study, the SVR rate was 81.2% (13/16) with IRRDR \geq 6 and 23.1% (6/26) with IRRDR \leq 5 ($p = 0.0002$), strongly suggesting that IRRDR \geq 6 would be a useful marker for the prediction of SVR.

By combining RI and IRRDR as a predicting factor, the SVR rate was 87.5% (7/8) in the RI-A group (RI-1st \leq 1.0) with IRRDR \geq 6, signifying that about 90% of these patients turned SVR and were, thus, believed to be very good responders. An SVR rate of 7.7% (1/13) was obtained in the RI-C group with IRRDR \leq 5 ($p = 0.0003$).

In conclusion, we propose that IRRDR combined with RIs is the most sensitive predictive factor for SVR and non-SVR. With the aid of RIs and IRRDR, a more effective PEG-IFN/RBV treatment could be within reach. A more detailed investigation with a larger number of subjects is needed to confirm the current results in patients given PEG-IFN/RBV combination therapy.

Acknowledgment

We are indebted to Yoshiko Kawamura for assistance in the preparation of the manuscript.

Disclosure Statement

No conflict of interest exists.

References

- 1 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958–965.
- 2 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncalves FL Jr, et al: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347:975–982.
- 3 Nakamura H: Early prediction of sustained viral responder and non-responder during interferon and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2005; 33:269–271.

- 4 El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H: Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 2008;48:38–47.
- 5 Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996; 334:77–81.
- 6 Akuta N, Suzuki S, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H: Prediction of response to pegylated interferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphism in the viral core protein and very early dynamics of viremia. *Intervirology* 2007;50:361–368.
- 7 Ferenci P: Predictors of response to therapy for chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 2004;24:S25–S31.
- 8 Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Higashi M, Ishibashi H: Effective prediction of outcome of combination therapy with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin in Japanese patients with genotype-1 chronic hepatitis C using early viral kinetics and new indices. *J Gastroenterol* 2009;44:338–345.
- 9 Sasase N, Kim SR, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Hotta H, Shouji I, El-Shamy A, Kawada N, Kudo M, Hayashi Y: Usefulness of a new immunoradiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral load of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology* 2008;51:S70–S75.
- 10 Davis GL: Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36: S145–S151.
- 11 Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS: Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science* 1998;282:103–107.
- 12 Lam NP, Neumann AU, Gretch DR, Wiley TE, Perelson AS, Layden TJ: Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology* 1997;26:226–231.
- 13 Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Neumann AU, Modi M, Colucci G, Roth WK: Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alfa-2a. *Gastroenterology* 2001;120: 1438–1447.
- 14 Silva M, Poo J, Wagner F, Jackson M, Cutler D, Grace M, et al: A randomized trial to compare the pharmacokinetic, pharmacodynamic, and antiviral effects of peginterferon alfa-2b and peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C (COMPARE). *J Hepatol* 2006;45:204–213.
- 15 Asahina Y, Izumi N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Doi F, et al: Pharmacokinetics and enhanced PKR response in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *J Viral Hepat* 2007;14:396–403.
- 16 Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Uchihara M, Nishimura Y, Inoue K, et al: A comparison of the exponential decay slope between PEG-IFN alfa-2b/ribavirin and IFN alfa-2b/ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C genotype 1b infection and a high viral load. *Intervirology* 2004;47:102–107.
- 17 Buti M, Sanchez-Avila F, Lurie Y, Stalgis C, Valdes A, Martell M, et al: Viral kinetics in genotype 1 chronic hepatitis C patients during therapy with 2 different doses of peginterferon alfa-2b plus ribavirin. *Hepatology* 2002;35:930–936.

表3 PEG-IFN, リバビリン併用療法における飲酒量別の治療効果と背景因子

	飲酒群 (n=15)	少量群 (n=44)	非飲酒群 (n=70)
SVR 率 (%)	46.7 %	50.0 %	57.1 %
年齢	52.4 ± 8.6	55.5 ± 7.7	54.6 ± 10.9
男:女	14:1	38:6	26:44
ウイルス量 (KIU/ml)	1682 ± 1457	1598 ± 1211	1628 ± 1253
γ-GTP (IU/L)	104.7 ± 74.2	58.7 ± 36.2	48.0 ± 34.3
ALT (IU/L)	99.5 ± 58.4	86.1 ± 65.1	87.7 ± 60.5
Plt (10 ³ /ml)	14.5 ± 5.0	14.3 ± 4.7	15.0 ± 4.9

* P<0.01

(山梨大学第一内科 2004 ~ 2008 年)

略語: 巻末の略語集参照

意差を認めている。しかし、intention-to-treat 解析では差を認めた
が、脱落例を除いた per-protocol 解析では有意差なしと考察してい
る。これら2つの報告から、リバビリン併用療法では、治療が完遂で
できれば過去の飲酒例においても非飲酒例と遜色ない治療効果が期待で
きるが、飲酒歴は脱落率と相関すると考えられた。

飲酒による IFN 治療効果への影響の評価のため、2004 ~ 2008 年
の間に当科にて1型高ウイルス量のC型慢性肝炎に対して Peg-
IFNα2b-リバビリン併用療法を導入した129例を、過去の飲酒量別
に1日3合以上の飲酒群、3合未満の少量群、非飲酒群の3群に分類
し検討した。全例で治療期間中の禁酒は徹底された。飲酒群15例で
の著効率は46.7%、少量群44例では50%、非飲酒群70例では
57.1%であり、3群間に有意差は認めなかった(表3)。飲酒群と少
量群では非飲酒群と比較し有意に男性が多く、γ-グルタミルトラン
スフェラーゼ(γ-GT)値は飲酒群で少量群と非飲酒群に比較し有意
に高値であった。年齢、ウイルス量、アラニンアミノトランスフェラ
ーゼ(ALT)値、血小板数では3群間に有意差を認めなかった。こ
の結果から、治療期間中の禁酒が徹底されていれば過去の飲酒量にか

かわらず抗ウイルス効果が期待できるため、常習飲酒者へは禁酒指導を行い、受け入れがよければ積極的に抗ウイルス療法を検討すべきと考える。

おわりに

ウイルス性肝炎患者では飲酒により慢性肝疾患の進行が速められ、合併症の発症や死亡までの期間が短縮されると考えられる。また、C型慢性肝炎における Peg-IFN α 2b-リバビリン併用療法では禁酒の徹底により非飲酒者と変わらない抗ウイルス効果が期待できる。そのため、すべてのステージの慢性ウイルス性肝炎患者で禁酒、節酒の指導を徹底するべきで、禁酒可能なC型慢性肝炎例においては積極的なIFN治療の導入が望ましい。

井上 泰輔・坂本 穰・榎本 信幸

文献

- 1) 堀江義則: アルコール性肝硬変の実態と性差についての研究 平成 19 年度厚生労働科学研究費報告書. わが国における飲酒の実態ならびに飲酒に関連する生活習慣病, 公衆衛生上の諸問題とその対策に関する総合的研究. p121, 2008.
- 2) Otani K, et al: Hepatitis C virus core protein, cytochrome P450 2E1, and alcohol produce combined mitochondrial injury and cytotoxicity in hepatoma cells. *Gastroenterology* 128: 96-107, 2005.
- 3) Poynard T, et al: Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 349: 825-832, 1997.
- 4) Marcellin P, et al: Mortality related to chronic hepatitis B and chronic hepatitis C in France: Evidence for the role of HIV coinfection and alcohol consumption. *J hepatol* 48: 200-207, 2008.
- 5) 門倉 信, 他: 肝硬変の成因別実態. 肝硬変の成因別実態 2008 (恩地森一 監), p161. 中外医学社, 東京, 2008.
- 6) Pessione F, et al: Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 27: 1717-1722, 1998.
- 7) Romero-Gomez M, et al: Intrahepatic hepatitis C virus replication is increased in patients with regular alcohol consumption. *Dig Liver Dis* 33: 698-702, 2001.
- 8) McCartney EM, et al: Alcohol metabolism increases the replication of hepatitis C virus and attenuates the antiviral action of interferon. *J Infect Dis* 198: 1766-1775, 2008.
- 9) Zang T, et al: Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression. *Hepatology* 38: 57-65, 2003.
- 10) Norkina O, et al: Acute alcohol intake induces SOCS1 and SOCS3 and inhibits cy-

- tokine-induced STAT1 and STAT3 signaling in human monocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 32 (9): 1565-1573, 2008.
- 11) Szabo G, et al: Reduced alloreactive T-cell activation after alcohol intake is due to impaired monocyte accessory cell function and correlates with elevated IL-10, IL-13, and decreased IFN γ levels. *Alcohol Clin Exp Res* 25 (12): 1766-1776, 2001.
 - 12) Loguercio C, et al: Drinking habits of subjects with hepatitis C virus-related chronic liver disease: prevalence and effect on clinical, virological and pathological aspects. *Alcohol Alcohol* 35: 296-301, 2000.
 - 13) Ohnishi K, et al: Interferon therapy for chronic hepatitis C in habitual drinkers: comparison with chronic hepatitis C in infrequent drinkers. *Am J Gastroenterol* 91: 1374-1379, 1996.
 - 14) Okazaki T, et al: Efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. Comparison between non-drinkers and drinkers. *Scand J Gastroenterol* 29: 1039-1043, 1994.
 - 15) Anand BS, et al: Alcohol use and treatment of hepatitis C virus: Results of a national multicenter study. *Gastroenterology* 130: 1607-1616, 2006.
 - 16) Chang A, et al: The impact of past alcohol use on treatment response rates in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 701-706, 2005.

特集Ⅱ C型肝炎ウイルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用

HCV全アミノ酸解析を用いた PEG-IFN/RBV併用療法治療 反応性の検討*

前川 伸哉****
坂本 穰****
榎本 信幸****

Key Words: pegylated-interferon plus ribavirin therapy, hepatitis C virus (HCV), HCV full open reading frame analysis, IL28B

はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)に対する現在の標準治療法であるペグ化IFN(PEG-IFN)/ribavirin(RBV)併用48週療は、難治型であるゲノタイプ1bのHCVに限っても約5割の症例においてsustained viral response(SVR)が得られる治療であり、以前行われたインターフェロン(IFN)単独療法と比較して大きく進歩した。一方で、PEG-IFN/RBV療法はいまだに半数の症例が無効となるいまだ不十分な治療とも逆にいえるが、2011年の市場導入が予想されているプロテアーゼ阻害薬との併用によって治療効果はさらに大きく改善されることが期待されている。しかし、どのような症例が現行の治療で完治し、どのような症例が治療抵抗性となっていくのか現行治療の限界を明らかにすることは、新しい時代の治療適応を判別する上でも非常に重要なことと考えられる。

治療効果に関連する因子として、われわれはIFN単独療法時代にウイルス側因子に注目し、HCV

のコードする非構造蛋白nonstructural(NS)5Aには、IFN治療効果を規定するISDR(interferon sensitivity determining region; インターフェロン感受性規定領域)が存在することを見出し、ISDRに多数の変異があるとSVRとなることを報告し、臨床的有用性について明らかにした^{1)~3)}。しかし、PEG-IFN/RBV時代においてもISDRは治療効果に強く関与したが、強力な同療法の下ではISDRにほとんど変異がなくとも、SVRとなる症例の存在することが臨床的観察から明らかとなっていた。われわれはPEG-IFN/RBV時代において治療効果を規定するHCV領域について、ウイルス動態とHCV全翻訳領域の詳細な検討を行うことにより明らかとした。本稿ではわれわれの上記の検討を中心に概説する。

12週までの初期ウイルス反応性と最終治療効果

われわれは、PEG-IFN/RBV治療を導入したゲノタイプ1bのHCV感染症例連続103人に対し、治療導入前の血清からHCVウイルス全翻訳領域をダイレクトシーケンスで決定し、臨床背景因子との関連を明らかとすることとした(図1)。PEG-IFN/RBV最終治療効果を占う重要因子としては、治療早期の反応性が知られているが、特に治療導

* Investigation of the response to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV infection through viral full open reading frame analysis.

** Shinya MAEKAWA, M.D., Ph.D.: 山梨大学医学部肝疾患地域先端医療システム学[☎409-3898 中央市下河東1110]; Department of Frontier Medical System for Liver Disease, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, Chuo 409-3898, JAPAN

*** Minoru SAKAMOTO, M.D., Ph.D. & Nobuyuki ENOMOTO, M.D., Ph.D.: 山梨大学医学部肝疾患センター

**** 山梨大学医学部第1内科

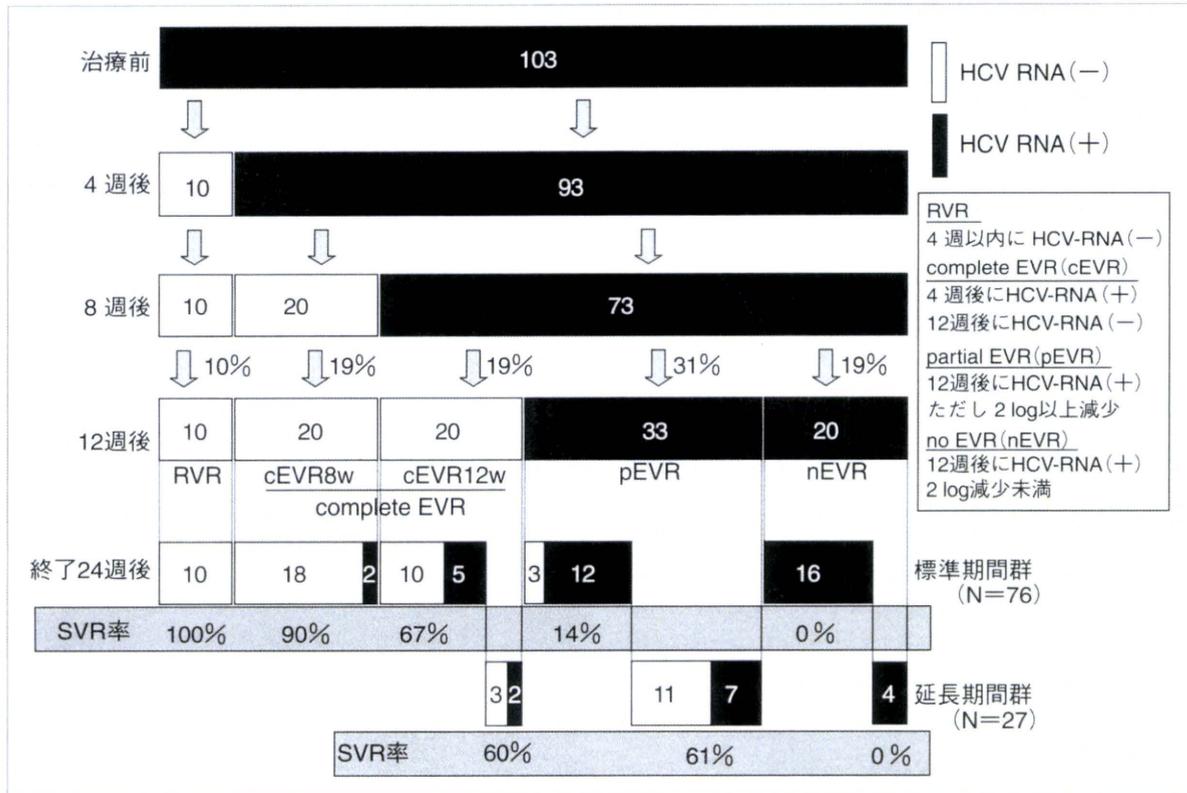


図 1 Peg-IFN/RBV併用療法における12週までのウイルス消失とSVR

入後12週までのウイルス反応性が、SVRに強く関連することが報告されている³⁾。われわれの103症例において12週までの治療反応性と最終治療効果の関連を検討した。図1に示すように、4週でのウイルスが検出感度未満となった症例をRVR (rapid viral responder)、12週でなったものをcEVR (complete early viral responder)、12週でウイルス陽性であるものの治療前と比べて100分の1以下に減少したものをpEVR (partial early viral responder)、12週でウイルス陽性、かつ100分の1未満のものをnon-EVRと命名した。cEVRはさらに8週(cEVR-8w)、12週(cEVR-12w)までに検出感度未満になったものに分類した。するとこの分類と最終治療効果は強く関連することが本治療群でも検証された(図1)。すなわちPEG-IFN/RBV治療反応性において、それぞれの集団内部では同じ性質を持つ症例が集まっているものと考えられる。各集団を特徴づけるHCVの遺伝子領域の存在を明らかとするためにすべての症例でHCV全翻訳領域を決定することとした。

スライディングウインドウ解析を含む解析方法について

HCV全長遺伝子は約9,600塩基の一本鎖RNAからなるが、3,010個のアミノ酸からなるウイルス蛋白は1個の読み枠(open reading frame)で翻訳されたのちに成熟蛋白となる。われわれはこれを20のフラグメントに分割して、2ステップのpolymerase chain reaction (PCR)にて増幅し、ダイレクトシーケンス法でドミナントなアミノ酸配列を決定した(図2)。

実際の検討に当たっては、比較検討する2群において3,010アミノ酸各部位における各群のアミノ酸残基出現頻度を比較した。さらに本検討において、単一のアミノ酸の比較のみではなく、“スライディングウインドウ解析”によるウイルス“領域”の比較を行った(図3)。すなわち、2群の違いは1アミノ酸のみに起こるとは限らず、まとまったアミノ酸領域として生じる可能性がある。たとえば図3のような場合では、アミノ酸6番から19番までの14アミノ酸にAとBの

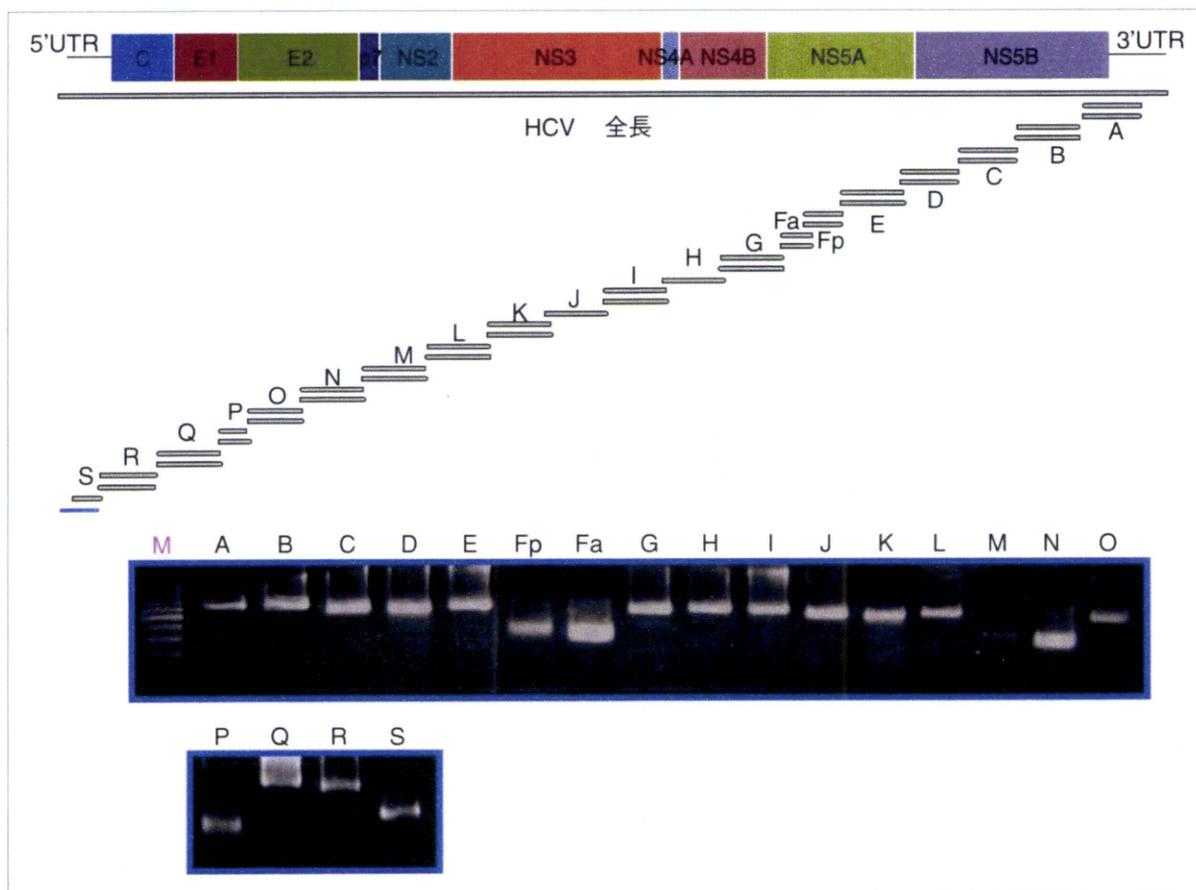


図2 PCRを用いたHCV全長解析方法
A~Sは各PCRフラグメント，下はPCR産物の電気泳動，Mはサイズマーカー。

違いが集中していることが理解されると思う。
このような例では図の右に示すが，アミノ酸1個の違いを比較してもA群とB群の違いの有意差は小さいが，アミノ酸6番から19番までの変異数合計ではA群とB群で平均アミノ酸変異数は大きく異なり，治療反応性と関連する領域であることがわかる。われわれはC型肝炎ウイルスの全アミノ酸解析においても，隣り合うアミノ酸変異を合計して，領域としてもアミノ酸の変異を検討した。

PEG-IFN/RBV治療効果と関連するHCVウイルス領域の検討

1. RVR群と非RVR群におけるウイルス配列の違い

上記に述べたように，われわれの症例を12週までの治療反応性によって5つのサブグループに分類し，それぞれの群における特徴的なウイルス配列の有無を全翻訳領域にわたり検討する

こととした。はじめにRVR群と非RVR群の2群間の違いについて比較したところ，図4-aに示すようにNS5Aの複数のアミノ酸部位(2240, 2355など)が有意差をもって2群で異なる領域として抽出された。一方，図4-aをみるとNS5Aのこれらの部分周囲にも小さなピークがいくつか存在しており，単一のアミノ酸よりも領域として変異が起きやすい可能性が考えられた。

そこで次にスライディングウインドウ解析を行った(図4-b)。スライディング解析において合計するアミノ酸幅を1から100までのウインドウ幅まで広げた解析を行い，有意差がある部分を色の濃淡で表し，最も大きい有意差を示すものを白色で表すようにエクセルでプログラムを作成して解析した。すると特にNS5Aに色の濃い部分が集中しているのがわかる。本検討では，特にNS5Aのアミノ酸番号2224から2248までの25アミノ酸領域が最も異なるP値を示す領域として抽出されたが，この領域はインターフェロン単

		ウインドウ幅 1 (アミノ酸番号 6)														ウインドウ幅 14 (アミノ酸番号 6~19)														アミノ酸変異数											
		ウインドウ幅 1 (アミノ酸番号 6)														ウインドウ幅 14 (アミノ酸番号 6~19)																									
アミノ酸番号	コンセンサス配列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	ウインドウ幅 1 アミノ酸番号 6	ウインドウ幅 14 アミノ酸番号 6~19			
症例 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	T	S	I	E	A	W	R	O	H	M	G	G	N	I	T	H	-	0	1		
症例 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	
症例 3	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	
症例 4	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	0	1		
症例 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	
症例 6	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	
症例 7	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	
症例 8	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1	
症例 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1
症例 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
																														平均変異数	0.1	0.6									
症例 1	V	-	-	-	-	-	A	-	G	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4		
症例 2	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2		
症例 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2		
症例 4	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	0	2		
症例 5	-	-	-	-	-	-	-	-	A	N	-	V	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	4		
症例 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	3		
症例 7	-	-	-	-	-	-	-	R	-	Y	-	-	V	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	4		
症例 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2		
症例 9	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2		
症例 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	4		
																														平均変異数	0.3	2.9									

図 3 スライドインディングウインドウ解析

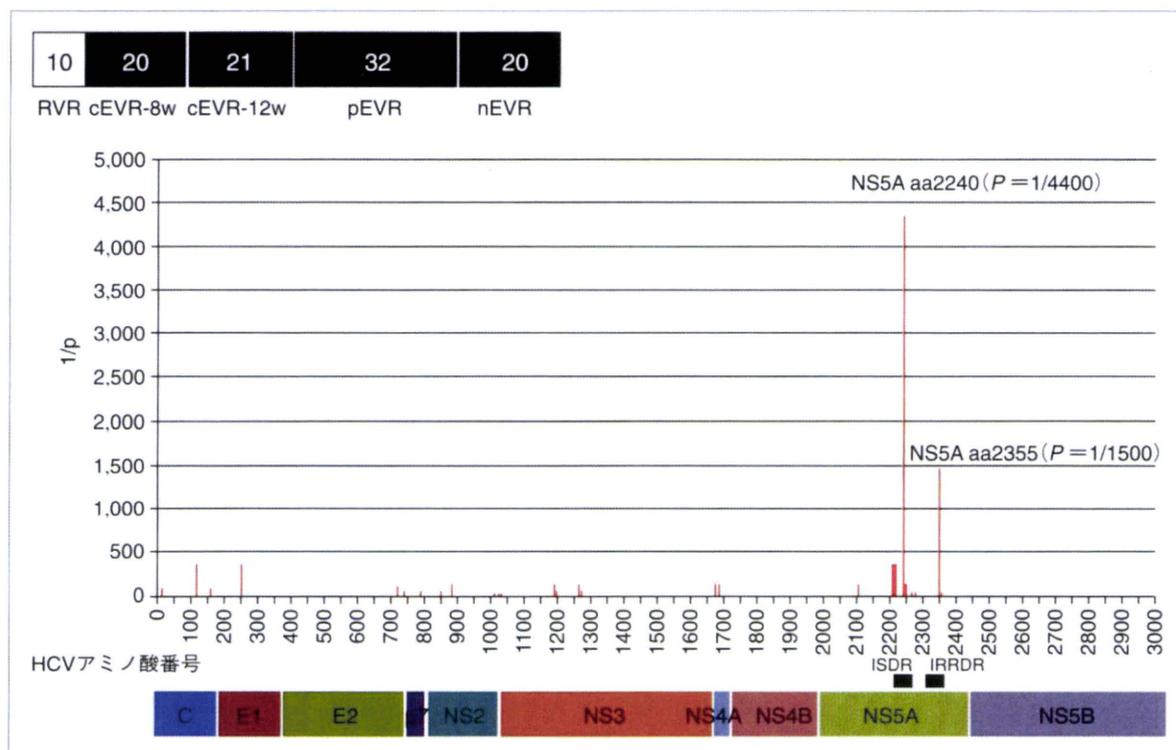


図 4-a HCVアミノ酸の違い—RVR群 vs. RVR以外—
単一アミノ酸ごとの解析.

独時代にインターフェロン感受性を決定する領域として報告されたISDRに含まれており、PEG-IFN/RBV併用療法においてRVRと強く関連する領域はISDRであることが示された(図 4-b). すなわち、この領域にアミノ酸変異が多く存在するものほどRVRになりやすく、一方、変異のないものはRVRになりにくいことが明らかとなった.

2. Non-EVR群と非Non-EVR群におけるウイルス配列の違い

次に12週でウイルスの反応性が最も悪いnon-EVR群のウイルス配列の特徴を検討することとした(図 5). まずウイルス各アミノ酸について比較したところ、図 5 に示すようにコアの70番のアミノ酸が最も大きな有意差を持って異なる部位として、著明な P 値を持って抽出された($P=7.0E-08$). 引き続きスライディングウインドウ解析によるアミノ酸領域としての検索も行ったが、アミノ酸“領域”としては抽出されず、やはりコア70番が最も異なるHCVのホットスポットとして抽出された. すなわち、コア70番が野生型のアルギニンではnon-EVRになるものがほとんどないのに比べて、グルタミンでは大半がnon-EVR

となっていた. すなわち、治療開始前のウイルスのコア70番がグルタミンの場合ではnon-EVRになる強力な予測因子であることがHCV全長解析によって明らかとなった.

3. SVR群とNon-SVR群におけるウイルス配列の違い

最終的な著効率の違いと、ウイルス配列がどのように関連するのかをウイルス各アミノ酸について、さらにスライディングウインドウ解析も行い検討した. 図 6 に示すようにSVR群とnon-SVR群との比較では、NS5Aアミノ酸番号2340から2382までの43アミノ酸領域部位が最終的に効果に最も関連する領域として抽出されたが、同領域はインターフェロン・リバビリン併用療法に関連する領域とされているIRRDRにほぼ合致していた. すなわち、この領域にアミノ酸変異が多く存在するものはSVRになりやすく、一方、変異の少ないものはSVRになりにくいことが示された. 興味深いことにIRRDRの後半部分はインターフェロン単独時代にやはり治療効果に関連するV3領域として報告されていたが、図 6 に示すようにPEG-IFN/RBV治療時代においても、