

## 原発性硬化性胆管炎の最近の話題

## 原発性硬化性胆管炎に対する肝移植の適応と問題点\*

田代 裕尊<sup>1)</sup>・田妻 進<sup>2)</sup>・佐々木民人<sup>3)</sup>・茶山 一彰<sup>3)</sup>  
 浅原 利正<sup>1)</sup>・大段 秀樹<sup>1)</sup>

要約：進行した原発性硬化性胆管炎（PSC）に対しては内科的治療はなく、唯一確立された治療法は肝移植である。PSCに対する肝移植は、肝不全症状や難治性胆管炎を呈した症例には適応されるが、その時期は予後予測式を参考に決定される。PSCは胆管癌や炎症性腸疾患を合併することが比較的多く、術前の胆管系の精査や炎症性腸疾患の内科的治療は重要である。本邦におけるPSCに対する生体肝移植（特に親から子への移植）の成績は他の肝疾患同様にその短・中期（移植後5年まで）成績は良好であるが長期予後（移植後10年）は不良である。この原因としてPSCの再発が高率に認められ、一旦再発を来すとPSCは進行し肝不全に至る。この再発を制御できる治療法は現在確立されておらず対症療法または可能であれば再移植のみとなる。今後、生体肝移植と比較し再発リスクの少ない脳死肝移植の推進が待たれる。

Key words：原発性硬化性胆管炎，生体肝移植，現疾患再発，胆管癌

## はじめに

原発性硬化性胆管炎（Primary Sclerosing Cholangitis：PSC）は、肝内・肝外胆管に原因不明の線維性狭窄を来し胆汁うっ滞から肝硬変へと進展し最終的には肝不全に至る難治性の肝疾患である。病理組織学的にはリンパ球、多核白血球などの炎症細胞の浸潤と線維化を伴う慢性胆管炎であり、特徴的所見としてタマネギ状の胆管周囲求心性巣状線維化（onion-skin fibrosis）を認めることもある。

PSCは胆管病変に加え、炎症性疾患特に潰瘍性大腸炎との合併率が高く、欧米では約70%に、わが国では約40%に合併することが報告されている<sup>1)</sup>。PSCは若年男性に多いとされるが、わが国では中高年（40～50歳）に発症することが多く、進行性である。治療は内科的治療（胆汁酸、免疫抑制）、内視鏡的治療（胆管ス

テント挿入）が行われるが、これらの治療にもかかわらず病状が進行すれば肝移植の適応となる。肝移植を施行した場合、その予後は欧米では1年生存率は90%から94%、5年85%前後、10年70%と他の肝疾患と同様に良好であるが、PSCの再発は7年のフォローで約20%に認め、その再発がグラフトロスに繋がること報告されている<sup>2)</sup>。一方、わが国では日本肝移植研究会での肝移植症例登録報告2009年において初回生体肝移植が5,058例に施行され、その内PSCに対して139例に施行されている。その短期生存率は原発性胆汁性肝硬変症（PBC）を代表とする他の胆汁うっ滞性肝疾患と同様良好であるが、長期成績では不良で、PBCの累積生存率は1年81%、5年77%、10年73%に対して、PSCでのそれは1年81%、5年75%、10年59%であった<sup>3)</sup>。PSCでは、再発によるグラフトロスやPSCに併発する胆管癌、潰瘍性大腸炎などの特有の問題点を有しており、本稿ではPSCに対する肝移植の適応、タイミング、手術手技、移植後のQOL、再発などの問題点について自験例を交え概説する。

## I. 適応（移植時期）

どの時点で移植のインフォームドコンセントを行う

\* Indication of Liver Transplantation for Primary Sclerosing Cholangitis

1) 広島大学病院移植外科（〒734-8551 広島市南区霞1-2-3）

2) 同 総合診療部

3) 同 消化器内科

表 1 予後予測式

|                |   |
|----------------|---|
| New Mayo Model | $R = 0.03 \times (\text{age in years}) + 0.54 \log_e (\text{bilirubin in mg/dl}) + 0.54 \times \log_e (\text{aspartate aminotransferase in U/ml}) + 1.24$ (if history of variceal bleeding*) $- 0.84 \times (\text{albumin in g/dl})$ |
| MELD           | $\text{MELD score} = 3.8 \times \log_e (\text{T. Bil in mg/dl}) + 11.2 \times \log_e (\text{INR}) + 9.6 \times \log_e (\text{creatinine in mg/dl}) + 6.4 \times (\text{etiology : 0 if cholestatic or alcoholic, 1 otherwise})$       |

\*有のとき1点、無のとき0点

か、あるいは移植時期の決定に関しては、PSCに限らず判断に迷うことがある。肝腎症候群に移行して移植のタイミングが遅れると移植後早期の予後は不良となる一方で、移植時期が早すぎても移植周術期のリスクや免疫抑制剤などの長期投与に伴う副作用のリスクが原疾患のリスクを上回る可能性がある。

繰り返す食道静脈瘤の破裂、難治性腹水、肝性昏睡の存在は他の肝疾患同様に移植の適応となる。PSC特有の適応として、繰り返す胆管炎、薬物治療に抵抗性の搔痒感、があげられる。これらの症状は患者のQOLを著しく損なうもので、あらゆる薬物治療や内視鏡的治療に抵抗性の場合には肝移植の適応となる。この全身搔痒感は必ずしも肝機能、門脈圧亢進症の程度や組織学的肝硬変の進行度と相関しない。一方、PSC特有の術前問題点として骨異栄養症、潰瘍性大腸炎、胆管癌の合併があげられる。骨異栄養症は、胆汁うっ滞性肝疾患に共通する合併症であるが、進行すると脊椎の圧迫骨折から体動障害を伴う高度の背部痛を認めることもあり、術前には骨密度の測定による評価が必要である。骨密度低下ではカルシウム、ビタミンD、骨吸収抑制剤（ビスフォネート）、ホルモン療法などの内科的治療が必要となる。しかしながら、病的骨折に至った症例の多くは移植後の改善が困難なことが多く移植適応に慎重になることも多い。潰瘍性大腸炎合併例では、大腸癌の併存の可能性があり術前大腸内視鏡検査によるスクリーニングが重要である。また潰瘍性大腸炎自体の術前内科的コントロールも当然計られなければならない。PSCでは、胆管癌を10~20%に併発するといわれているが、わが国での最近の報告では、約4%と低値である<sup>4)</sup>。胆管癌併発の予測・診断を行うには困難な症例が多いが、内視鏡的検査による術前検査は重要である。腫瘍マーカー（CEA, CA19-9）を用いた予測もいくつか報告<sup>5-7)</sup>されているが、本特集での他稿において胆管癌の診断については詳述されているので参考にされたい。

従来からPSCの重症度、予後リスクを数値化して移植適応の指標に、あるいは欧米では移植順位の決定に使用されてきた。その代表的なものを表1に示す。

New Mayo modelの予後予測モデル<sup>8)</sup>はPSCの予後を予測するものとして現在最も頻用されている。Mayo clinicのホームページから予後予測のサイトに入り、年齢、血清ビリルビン値、AST (aspartate aminotransferase)、アルブミン値、プロトロンビン時間、食道静脈瘤からの出血の有無を入力するとRisk scoreが算出される。このモデルでは今後1年から4年までの予後が1年毎に自動計算される。New Mayo modelでは計算されたリスクスコアを基に0未満をlow risk group, 0以上2未満をintermediate risk group, 2以上をhigh risk groupに分け、intermediate risk groupでの1年、5年生存率はそれぞれ90%、80%以上であるが、high risk groupではそれぞれ50~60%、30~40%であり<sup>9)</sup>、PSCに対する肝移植成績では1年生存率は80%以上であることからこのスコアで2点以上である場合は移植も治療の選択肢として考慮すべきである。

肝予備能の指標として古くからChild-Pughスコアが用いられているが、Child-PughスコアはPSC患者の予後と相関しないことが多い。

末期肝不全の重症度を反映し、主に脳死ドナー肝の有効利用を目的として採用されている予測式としてMELD (The Model for End-Stage Liver Disease) scoreがある。当初、門脈圧亢進症に対するTIPS (Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt)の早期予後を反映するスコアとして提唱された予測式であったが、広く末期肝不全患者に適用されており、PBC特有の予測式ではない。MELDスコアを規定している因子は、血清ビリルビン値、クレアチニン値、INR、原疾患の種類で、ホームページ上で自動計算可能である。移植前のMELDスコア25点以上では移植後早期の予後は有意に不良であるが、PSCでは必ずしも予後と相関しないという報告もある。一般的にMELDスコア15点以上の末期肝硬変は移植の適応となり<sup>10)</sup>またわが国においても同様な結果を示している<sup>11)</sup>。

表 2 PSC 再発診断の基準

|   |
|---|
| Diagnosis   |
| Confirmed diagnosis of primary sclerosing cholangitis prior to liver transplantation and                                  |
| Cholangiography   |
| Intrahepatic and/ or extrahepatic biliary stricturing, beading, and irregularity >90 days                                 |
| or  |
| Histology   |
| Fibrous cholangitis and/ or fibro-obliterative lesions with or without ductopenia, biliary fibrosis, or biliary cirrhosis |
| Exclusion criteria  |
| Hepatic artery thrombosis/ stenosis   |
| Established ductopenic rejection  |
| Anastomotic strictures alone  |
| Nonanastomotic strictures before posttransplantation day 90   |
| ABO incompatibility between donor and recipient   |

## II. 手術手技

肝移植の手術手技に関しては、基本的には胆道再建以外は他の肝疾患と違いはない。PSCにおける胆道再建は肝外胆管病変のため胆管空腸吻合が基本的に行われている。しかしながら、胆管病変が肝内のみで肝外胆管に病変がおよんでいない症例では、胆管・胆管吻合が可能である。

## III. 移植後の癌再発と *de novo* 癌

移植時における摘出肝から胆管癌を少数の症例に認める<sup>12)</sup>。欧米での報告では、数%に胆管癌が報告され5年生存率はPSC単独症例では87%に対して胆管癌併発症例（術前、術中より診断された腫瘍、全症例の3%）では5年生存率は0%とその予後はきわめて不良であった<sup>13)</sup>。一方、偶発胆管癌（術後病理検査で発見された1cm以内の腫瘍、全症例の8%）を併発していた症例では5年生存率は83%とPSC単独症例と同等の成績であった<sup>13)</sup>。移植後の *de novo* 癌の発生も高いことがPSC症例では報告されている<sup>14)</sup>。PSC肝移植患者において皮膚癌以外の累積癌発症率は5年10%、10年21%（全体では、5年7%、10年14%）ときわめて高い。また、潰瘍性大腸炎合併症例のPSCからの肝内胆管癌と大腸癌の発症も報告されている<sup>15)</sup>。さらに、PSCは潰瘍性大腸炎における大腸癌の発症を促進するとの報告もある<sup>16)</sup>。潰瘍性大腸炎合併症における大腸癌の10、20年後の発症リスクは14%と31%と非合併症の5年2%、10年2%に比べ有意に高値であり、胆管癌の発症リスクも非合併例に比べ3倍高いと報告されている<sup>15)</sup>。潰瘍性大腸炎合併PSCに対する肝移植症例では、45ヵ月のフォローで6%に大腸癌の発症を

認めている<sup>17)</sup>。潰瘍性大腸炎合併症では、移植後の大腸内視鏡による術後フォローも重要である。

## IV. 肝移植後のPSC再発

PSCの再発は移植後のフォローにおいて重要な問題である。PSC再発診断は肝動脈血栓症、慢性拒絶反応、血液型不適合に起因する病変など多くのPSCに類似する胆管病変があり、しばしば診断に難渋する<sup>18)</sup>。診断には、組織学的または胆道造影検査を必要とし、診断基準が提唱されている（表2）。以前欧米の報告ではPSCの再発は約20%とされ予後には影響しないとされていた<sup>21,23)</sup>が、わが国では生体肝移植が多く、再発の頻度は高くしかも予後を左右している<sup>19)</sup>。Egawaら<sup>20)</sup>の報告においてその再発は約50%におよび、ほぼ全例が肝不全に至っている。再発因子として、親をドナーとする移植、若年者PSC症例などがあげられている。またMELDスコアが高値の症例では、PSC再発が高いと報告している。また最近の欧米からの報告でも、脳死肝移植において再発の頻度は、わが国における生体肝移植の頻度ほど高くはないが、一旦再発を認めた症例では予後が不良であるとする報告が多い。その再発のリスクとして、胆管癌の併発<sup>12)</sup>、術後のステロイド剤の長期投与<sup>21)</sup>、HLA<sup>22)</sup>などがあげられている。生体肝移植において有意にPSCの再発率が高いことより、遺伝的背景とPSCの再発については因果関係を有すると考えられるが、さらに今後の検証を要する。

## V. 自検例

2009年までに当科で施行した成人生体肝移植152例のうちPSCの症例は3例であった。移植直前のNew Mayo modelにおけるRisk scoreは前例2点以上で

あった。3例とも術前・術後に癌の発症は認めていないが、2例において潰瘍性大腸炎を合併していた。1例は生体腎移植術後約1ヵ月後より内科的治療に抵抗性の胆管炎を来しPSCの増悪により生体肝移植を施行したが、術後に敗血症を認め多臓器不全で2ヵ月目に死亡した。他の2例は移植後それぞれ2年、8ヵ月経過し、現在いずれの症例もPSCの再発を認めていない。

### おわりに

PSCに対する生体肝移植の短期成績は良好であり、肝移植の良い適応である。しかしながら、親族をドナーとする生体肝移植では高率に再発が認められ、長期予後が不良であるため、今後のさらなる再発因子の解析と対策が待たれる。また、再発リスクを避けるためにも、今後は欧米から報告されているように再発率が少ない脳死肝移植の推進が急がれる。

### 参考文献

- 1) Takikawa H : Characteristics of primary sclerosing cholangitis in Japan. *Hepatol Res* 37 : S470-S473, 2007.
- 2) Graziadei IW, Wiesner RH, Marotta PJ, et al. : Long-term results of patients undergoing liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 30 : 1121-1127, 1999.
- 3) 日本肝移植研究会 : 肝移植症例登録報告 2008. 移植 44 : 559-571, 2009.
- 4) Tanaka A, Takamori Y, Toda G, et al. : Outcome and prognostic factors of 391 Japanese patients with primary sclerosing cholangitis. *Liver Inter* 28 : 983-989, 2008.
- 5) Chalasani N, Baluyut A, Ismail, et al. : Cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis : A multicenter case-control study. *Hepatology* 31 : 7-11, 2000.
- 6) Nichols JC, Gores GJ, LaRusso NF, et al. : Predicting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis : An analysis of the serological marker CA 19-9. *Mayo Clin Proc* 68 : 874-879, 1993.
- 7) Ramage JK, Donaghy A, Farrant JM, et al. : Serum tumor markers for the diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 108 : 865-869, 1995.
- 8) Kim WR, Therneau TM, Wiesner RH, et al. : A revised natural history model for primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clin Proc* 75 : 688-694, 2000.
- 9) Kim WR, Poterucha JJ, Wiesner RH, et al. : The relative role of the Child-Pugh classification and Mayo natural history model in the assessment of survival in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 29 : 1643-1648, 1999.
- 10) Merion RM, Schaubel DE, Dykstra DM, et al. : The survival benefit of liver transplantation. *Am J Transplant* 5 : 307-313, 2005.
- 11) Ishigami M, Honda T, Okumura A, et al. : Use of the model for end-stage liver disease (MELD) score to predict 1-year survival of Japanese patients with cirrhosis and to determine who will benefit from living donor liver transplantation. *J Gastroenterol* 43 : 363-368, 2008.
- 12) Campsen J, Zimmerman MA, Trotter JF, et al. : Clinically recurrent primary sclerosing cholangitis following liver transplantation : a time course. *Liver Transpl* 14 : 181-185, 2008.
- 13) Goss JA, Shackleton CR, Farmer DG, et al. : Orthotopic liver transplantation for primary sclerosing cholangitis : a 12-year single center experience. *Ann Surg* 225 : 472-483, 1997.
- 14) Watt KDS, Pedersen RA, Kremers WK, et al. : Long-term probability of and mortality from de novo malignancy after liver transplantation. *Gastroenterology* 137 : 2010-2017, 2009.
- 15) Claessen MMH, Vleggaar FP, Tytgat KMAJ, et al. : High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 50 : 158-164, 2009.
- 16) Brentnall TA, Haggitt RC, Rabinovitch PS, et al. : Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 110 : 331-338, 1996.
- 17) Higashi H, Yanaga K, Marsh JW, et al. : Development of colon cancer after liver transplantation for primary sclerosing cholangitis associated with ulcerative colitis. *Hepatology* 11 : 477-480, 1990.
- 18) Graziadei IW, Wiesner RH, Batts KP, et al. : Recurrence of primary sclerosing cholangitis following liver transplantation. *Hepatology* 29 : 1050-1056, 1999.
- 19) Yamagiwa S, Ichida T : Recurrence of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis after liver transplantation in Japan. *Hepatol Res* 37 : S449-S454, 2007.
- 20) Egawa H, Taira K, Teramukai S, et al. : Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after living donor liver transplantation : a single center experience. *Dig Dis Sci* 54 : 1347-1354, 2009.
- 21) Cholongitas E, Shusang V, Papatheodoridis GV, et al. : Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 14 : 138-143, 2008.
- 22) Alexander J, Lord JD, Yeh MM, et al. : Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 14 : 245-251, 2008.

## 2. 副腎皮質ホルモン剤

——ステロイド投与患者における周術期管理\*

井手健太郎 大段 秀樹\*\*

〔要旨〕手術侵襲は生体にとって大きなストレスであるため、生体機能を調節する重要なホルモン系である視床下部-下垂体-副腎皮質系が大きく反応する。長期ステロイド投与患者では視床下部-下垂体-副腎皮質系が抑制されているため、侵襲下における急性副腎不全発症の高リスク群である。ステロイドカバーの目的は、このような患者の周術期にグルココルチコイドを追加ないし補充投与することで急性副腎不全を防止し、手術や麻酔に起因する低血圧、ショック、死亡などを回避することであるが、その副作用である創傷治癒遅延と易感染性を念頭におき、患者の全身状態に応じた必要最小限のステロイドを投与する必要がある。

### はじめに

副腎皮質ホルモン剤(グルココルチコイド)は、抗炎症・免疫抑制目的で関節リウマチや全身性エリテマトーデス(SLE)などの膠原病、白血病、潰瘍性大腸炎、気管支喘息などのアレルギー疾患、糸球体腎炎および臓器移植後などに対して、長期的に用いられている。このようなグルココルチコイド長期投与患者における手術では、侵襲に伴い急性副腎不全による重篤な血圧低下をきたす危険性があるため、周術期にグルココルチコイド(ストレスステロイド)を追加ないし補充投与するステロイドカバーが行われる<sup>1)</sup>。ステロイドカバーはその副作用である創傷治癒遅延と易感染性を考慮し、一律で大量のカバーから侵襲の種類や

程度、患者の全身状態に応じた必要最小限のステロイドを補充する投与方法が行われるようになってきた<sup>2)</sup>。

本稿では長期ステロイド投与患者の周術期管理とその注意点について、最新の知見を交えて概説する。

### 1. 侵襲に対する生体応答と グルココルチコイド

副腎皮質ホルモンは生体の恒常性を保つため必須のホルモンである<sup>3)</sup>。グルココルチコイドは副腎皮質で産生され、視床下部より分泌される corticotrophin-releasing hormone (CRH)、下垂体より分泌される副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone: ACTH)などによって分泌調節を受け、その調節系全体は視床下部-下垂体-副腎皮質系(hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis)と呼ばれている<sup>3)</sup>。健常成人では平常時に5~10mg/m<sup>2</sup>/日のコルチゾール(hydrocortisone 20~30mg/日, prednisolone 5~7mg/日に相当)<sup>4)</sup>が日内変動をもって分泌されて

キーワード: グルココルチコイド, 急性副腎不全, ステロイドカバー

\* Perioperative management for patients treated with glucocorticoids

\*\* K. Ide, H. Ohdan (教授): 広島大学外科.

いる<sup>2)</sup>。生体に侵襲が加わると血漿コルチゾール濃度はすぐさま上昇し始め、4~6時間で peak に達し、おおむね24時間で基準濃度に戻る。侵襲の程度によっては基準濃度に戻るのに48~72時間かかる<sup>4)</sup>。コルチゾールの分泌量は侵襲の程度で異なり<sup>5)</sup>、最大で約100mg/m<sup>2</sup>/日に産生量を増やし、生体の恒常性維持に寄与する。具体的には、循環の維持、電解質代謝、グルコース・脂質・蛋白代謝の維持、免疫能・創傷治癒能の維持などであり、各種臓器、組織における正常機能を維持するように働いている<sup>1,2,6,7)</sup>。

長期にわたるグルココルチコイドの投与は HPA axis を抑制する<sup>8)</sup>。また ACTH 分泌がなくなると数週間で副腎皮質が萎縮し、二次性副腎不全に陥る<sup>9)</sup>。副腎不全の症状として脱力、体重減少、低血圧、胃腸症状などがあり、検査所見として低ナトリウム血症、高カリウム血症、高クロール血症性代謝性アシドーシス、低血糖などがみられる<sup>1,7)</sup>。HPA axis が抑制された状態で手術を受けると、個体内で適切な ACTH やコルチゾールの産生ができず、低血圧性ショックに陥る<sup>9)</sup>。以上が長期ステロイド投与患者に対する手術侵襲による急性副腎不全発症の機序である。

## II. 副腎皮質機能検査と急性副腎不全発症の高リスク群

副腎皮質機能検査としては、血漿コルチゾール濃度測定と ACTH 刺激試験がある。成人における血中コルチゾール早期安静時基礎値は5~20 μg/dl であり、必ずステロイド内服前に採血しておく。ACTH 刺激試験は、合成 ACTH (tetracosacide acetate 250 μg) を筋注あるいは静注して刺激前の基礎値と ACTH 投与1時間後の血漿コルチゾールを測定し、その上昇の程度をみる検査であり、正常な場合は7~18 μg/dl の範囲で上昇する。血漿コルチゾール値の低下や ACTH 刺激試験における低反応の場合は副腎不全の存在を示し、周術期のステロイド補充療法が必要である<sup>1,6)</sup>。しかし、通常の手術では術前に副腎機能を評価することはほとんどないが、グルココルチコイド服用が原因の手術(消化性潰瘍穿孔など)では、ACTH 刺激試験で副腎機能を評価してステロイド使用を検討すべきであろう<sup>1)</sup>。

HPA axis は1日あたり prednisolone 5mg 相当

以下の投与では、投与期間によらず正常に維持される<sup>2,6,8)</sup>。3週間以内の投与であれば、投与されたグルココルチコイドの種類・量によらず正常な HPA axis が維持されるといわれているが、明確な結論が出ているわけではない。またグルココルチコイドの投与を中止してから HPA axis の機能が正常化するまで1年間を要するといわれている<sup>2)</sup>。よって、過去1年間に3週間以上にわたり1日あたり prednisolone 20mg 相当以上のグルココルチコイドを投与されている場合、あるいは投与量にかかわらず Cushing 症候群を有している場合は HPA axis が抑制され、副腎機能低下状態にあると判断すべきである<sup>8)</sup>。また、過去1年間に3週間以上にわたり1日あたり prednisolone 5~20mg 相当を投与されている場合は、ACTH 刺激試験などの副腎皮質機能検査により現存の副腎機能を評価するか、副腎機能低下があるものとして対応する<sup>8)</sup>。しかし実際には、グルココルチコイドを投与されていた患者における HPA axis 抑制の程度を投与期間、最高投与量、総投与量などから正確に予測することは困難である<sup>2,7)</sup>。

## III. 急性副腎不全とステロイドカバー

副腎不全による低血圧は治療抵抗性で輸液や昇圧薬に反応せず、発熱も抗生物質では治まらないとされている。周術期に急性副腎不全が起こると、原因不明の治療抵抗性の血圧低下として認識され、容易にショックとなり死亡へと移行する<sup>1)</sup>。

周術期ステロイドカバーの最初の報告は1953年の Lewis ら<sup>9)</sup>によるものであり、推奨されたステロイドカバー量は通常使用量の4倍以上で、以降グルココルチコイドを服用している患者あるいは最近まで服用していた患者には大量のステロイドを周術期に投与することが一般的になった。代表的な方法として hydrocortisone 200mg を術前投与し1週間程度で漸減する方法、あるいは術前・術中に hydrocortisone 100mg を投与し、漸減する方法がある<sup>10)</sup>。現在ではグルココルチコイド服用者の周術期急性副腎機能不全の発生率は高くないと思われ、また古典的な大量ステロイドカバーは必要ないと考えられている<sup>11)</sup>。しかし、発生率は低くても致死的な合併症であることから、大量ではないとしてもなんらかのステロイドカバーが行われている。

表1. ステロイドカバーのガイドライン(文献2より引用)

| 侵襲の程度 | 侵襲の種類                             | グルココルチコイド投与法   |
|-------|-----------------------------------|--|
| 軽度    | 単径ヘルニア手術, 大腸内視鏡検査, 微熱をきたす疾患       | hydrocortisone 25mgまたはmethylprednisolone 5mgを手術当日あるいは発症時に静注  |
| 中等度   | 開腹胆嚢摘出, 結腸半切除, 高度発熱性疾患, 肺炎, 重症胃腸炎 | hydrocortisone 50~75mgまたはmethylprednisolone 10~15mgを手術当日あるいは発症時に静注し, 漸減し1~2日間で通常量に戻す   |
| 高度    | 心血管, 胸部手術, 膝頭十二指腸切除, 肝切除, 急性膵炎    | hydrocortisone 100~150mgまたはmethylprednisolone 20~30mgを手術当日あるいは発症時に静注し, 漸減し2~3日間で通常量に戻す   |
| 重症    | 敗血症性ショック                          | hydrocortisone 50~100mgを6~8時間ごとに静注または0.18mg/kg/時の持続静注にfludrocortisone 50μg/日をショックから離脱するまで(数日から1週間程度)投与する. 徐々にバイタルサインや血清ナトリウム濃度をモニタリングしつつ漸減する |

5mg/日以下の prednisolone を投与されている患者では, 通常の維持量の投与は必要であるが, 追加の必要はない  
5mg/日以上 prednisolone を投与されている患者では, 通常の維持量に加えて上記を投与する

2002年に Coursinら<sup>2)</sup>は, 患者病態別に必要投与量を提唱したステロイドカバーのガイドラインを報告した(表1)。このガイドラインは経験に基づいたものであり, 大規模研究に基づいたものではないためいまだ議論の余地がある。しかし, 従来の経験的に設定されていた事例を見直し, その過剰さを副作用の点から反省したうえで設定し直し, 侵襲の程度に応じてバリエーションをもたせていることと, 概して少量で短期的であることなど参考にすべき点が多い。より適切なステロイドカバーの適応や投与方法, 投与期間などに関して今後の研究の発展が期待される<sup>2,6,7,12)</sup>。

#### IV. 創傷治癒障害と易感染性

動物実験での副腎摘出モデルにおいて創傷治癒反応や感染抵抗性が減弱することから, 生理的範囲内のグルココルチコイドは創傷治癒に必須である<sup>13)</sup>。しかし, 過量のグルココルチコイドは, 創傷治癒機転の段階の中で抗張力, 上皮化, 血管新生, 創収縮などすべての過程を遅延させ, 創傷治癒能力を低下させるとともに免疫能を低下させ, 易感染状態をきたす。よって, 一般的には「ステロイド=創傷治癒阻害因子」と認識されている<sup>6)</sup>。

創傷治癒過程が各種サイトカインと免疫担当細胞から線維芽細胞などのカスケードで形成される炎症反応そのものであり, この炎症反応を抑制す

る比較的高用量のステロイド投与が創傷治癒反応に抑制的に作用すると考えられる<sup>6)</sup>。また長期ステロイド投与患者に非薄化した皮膚や筋萎縮を認めた場合は, ステロイドによる蛋白異化が亢進していることを示唆し, 創傷治癒に不利な状況であるため注意を要する<sup>6)</sup>。

臨床的には, 長期ステロイド投与患者の消化管吻合は縫合不全発生のリスクが高いと考えられるため, 状況に応じた安全性・確実性の高い吻合法の選択や, 人工肛門造設・二期的再建など吻合のない術式の選択を考慮する必要がある<sup>6)</sup>。また易感染性に伴う創感染の高リスク状態と考えられるため, 適切な手術部位感染対策も重要である<sup>7)</sup>。臨床的にはまだ認知はされていないが, ビタミンAの術前あるいは術後の投与によって, ステロイドのための創傷治癒障害を軽減できたという報告もあり<sup>14)</sup>。臨床的な至適投与方法などを含めて今後の研究が期待される。

#### おわりに

長期ステロイド投与患者における, 急性副腎不全を回避するための周期型ステロイドカバーの重要性と創傷治癒反応における至適量のステロイドの有用性に関して述べた。ステロイドカバーに関しては, 一律で大量のカバーから侵襲に応じた段階的な投与方法にかわりつつあるが, 一定の結論が

あるわけではない。侵襲の種類や程度、麻酔管理、患者の全身状態を考慮したうえで、個別に至適投与法を検討することが肝要である。

◆ ◆ ◆ 文 献 ◆ ◆ ◆

- 1) 松山博之, 入田和男, 高橋成輔: ステロイドカバー—最近の考え方. 臨麻 28 : 219-225, 2004
- 2) Coursin DB, Wood KE : Corticosteroid supplementation for adrenal insufficiency. JAMA 287 : 236-240, 2002
- 3) Selye H : The significance of the adrenals for adaptation. Science 85 : 247-248, 1937
- 4) Thoren L : General metabolic response to trauma including pain influence. Acta Anaesth Scand 55 : 9-14, 1974
- 5) Hume DM, Bell CC, Barter FC : Direct measurement of adrenal secretion during operative trauma and convalescence. Surgery 52 : 174-187, 1962
- 6) 宮田 剛, 標葉隆三郎: 長期ステロイド治療患者における消化管手術とステロイドカバー. 臨外 57 : 939-944, 2002
- 7) 須田康一, 竹内裕也, 菅沼和弘ほか: ステロイド投与患者の周術期管理. 外科治療 98 : 367-371, 2008
- 8) Jabbour SA : Steroids and the surgical patient. Med Clin North Am 85 : 1311-1317, 1991
- 9) Lewis L, Robinson RF, Yee J et al : Fatal adrenal cortical insufficiency precipitated by surgery during prolonged continuous cortisone treatment. Ann Intern Med 39 : 116-126, 1953
- 10) 稲田英一: ステロイドカバー. 麻酔 47 : S70-S76, 1998
- 11) Levy A : Perioperative steroid cover. Lancet 347 : 846-847, 1996
- 12) Jacob J : Corticosteroid replacement in critically ill patients. Crit Care Clin 22 : 245-253, 2006
- 13) Matsusue S, Walser M : Healing of intestinal anastomoses in adrenalectomized rats given corticosterone. Am J Physiol 263 : R164-R168, 1992
- 14) Phillips JD, Kim CS, Fonkalsrud EW et al : Effects of chronic corticosteroids and vitamin A in the healing of intestinal anastomoses. Am J Surg 163 : 71-77, 1992

\*

\*

\*

# 肝移植における免疫モニタリング

大段 秀樹\*

## Frontier in Liver Transplantation

### Liver Transplant Frontier

#### Immunomonitoring in liver transplantation

Hideki Ohdan\*

key words : 免疫モニタリング, 肝移植, 拒絶反応, 免疫寛容

肝移植後では、免疫抑制薬を徐々に減量可能であるというコンセンサスはあるものの、なにを指標にしてどの程度まで減量するかは、各施設によって方針が異なります。当施設における免疫モニタリングの実際とそれによる免疫抑制療法の最適化について紹介し、さらに、免疫抑制療法を最適化することによって得られる利点、特にB型肝炎

炎のワクチン療法とC型肝炎の免疫細胞療法の可能性についてもお話しします。

免疫モニタリング下における免疫抑制療法の最適化 私たちの行っている免疫モニタリングは、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したリンパ球混合試験(mixed lymphocyte reaction assay : MLR)です<sup>1,2)</sup>(図1)。

CFSE色素は細胞傷害性なく細胞内蛋白を染色し、細胞分裂回数に比例して色素が半減化する性

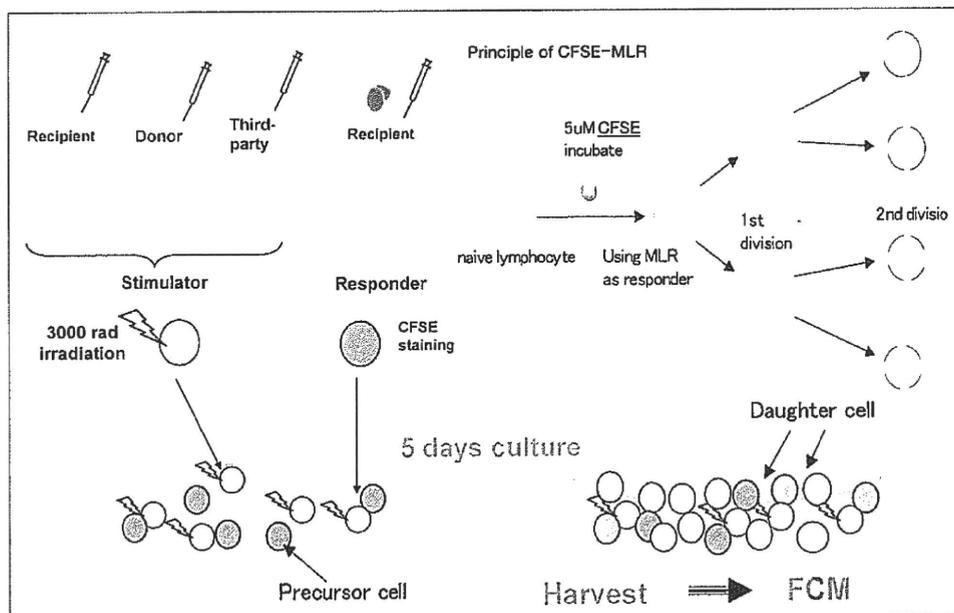


図1 CFSE 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したリンパ球混合試験

\*Department of Surgery, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University 広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学

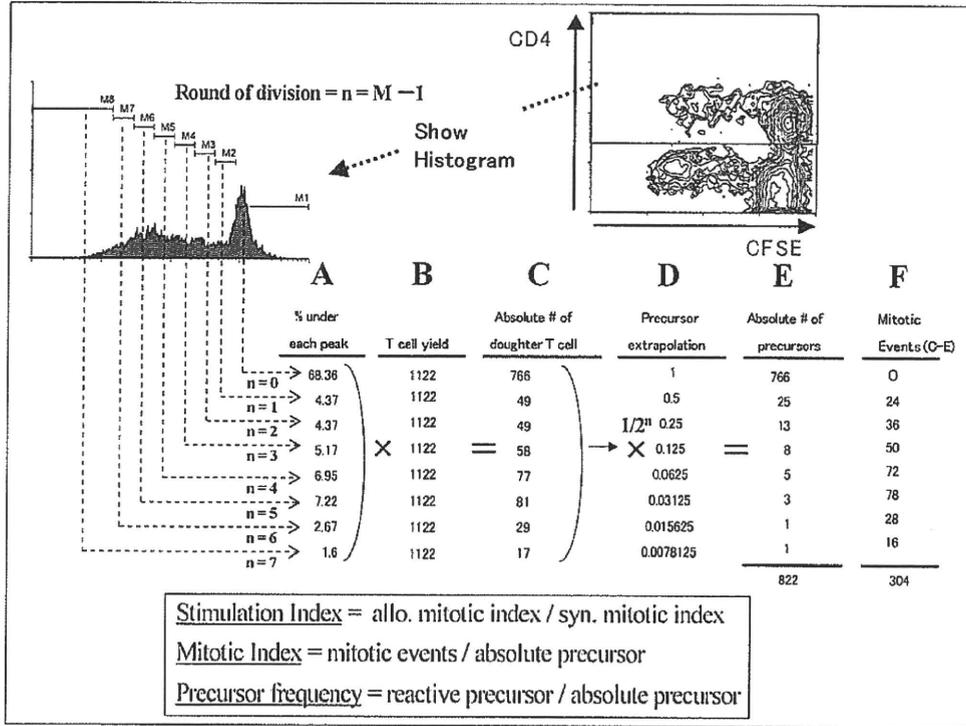


図2 アロ反応性T細胞の precursor frequency, mitotic index と stimulation index の定量法 (Tanaka Y et al. : Immunol Invest 33 : 309-324, 2004<sup>1)</sup>より)

質を有し、反応性リンパ球の表面分子や活性化マーカーと同時にフローサイトメトリーを用いて解析できるため、反応性T細胞の precursor frequency, mitotic index や stimulation index (SI) の算出、定量化が可能です(図2)。

すなわち、4~5日間リンパ球培養後にフローサイトメーターで解析します。フローサイトメーターではCD4あるいはCD8表出によって展開してCFSEのintensityを測定し、SIを計算します。同時に、CD8T細胞上のCD25表出率を測定します。その理由は、CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞に抗ドナー細胞傷害性を認め、CD25<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞には抗ドナー細胞傷害性がほとんど存在しないからです。

また、MLRのフローサイトメーター解析時に、細胞内サイトカイン染色を同時に施行すると、増殖するCD4T細胞にのみIL-2産生が観察できます。そして、増殖するCD8<sup>+</sup>T細胞はインター

フェロンγ(IFNγ)を産生していることが確認できます。したがって、CD4<sup>+</sup>T細胞の抗ドナー応答(stimulation index)をカルシニューリンインヒビター(CNI)増減の指標として使い、CD8<sup>+</sup>T細胞の抗ドナー応答をステロイドの増減の指標として用いています。

図3は、MLRデータに基づいた免疫抑制薬の最適化アルゴリズムです。MLR後にフローサイトメーターで解析して、CD8<sup>+</sup>T細胞のSIを算出します。前感作のないCD8<sup>+</sup>T細胞のSIの平均値が2ですから、2以上か2未満かで分類します。つぎに、抗ドナー応答と抗third-party応答の優位性を判定します。そしてCD25分子の表出率をもって、CD8の抗ドナー応答の亢進(hyper-response on CD8<sup>+</sup>T細胞)があるかどうかを判定します。

CD8<sup>+</sup>T細胞のSIが2以下である場合には、CD4<sup>+</sup>T細胞の応答を観察します。同じく平均値

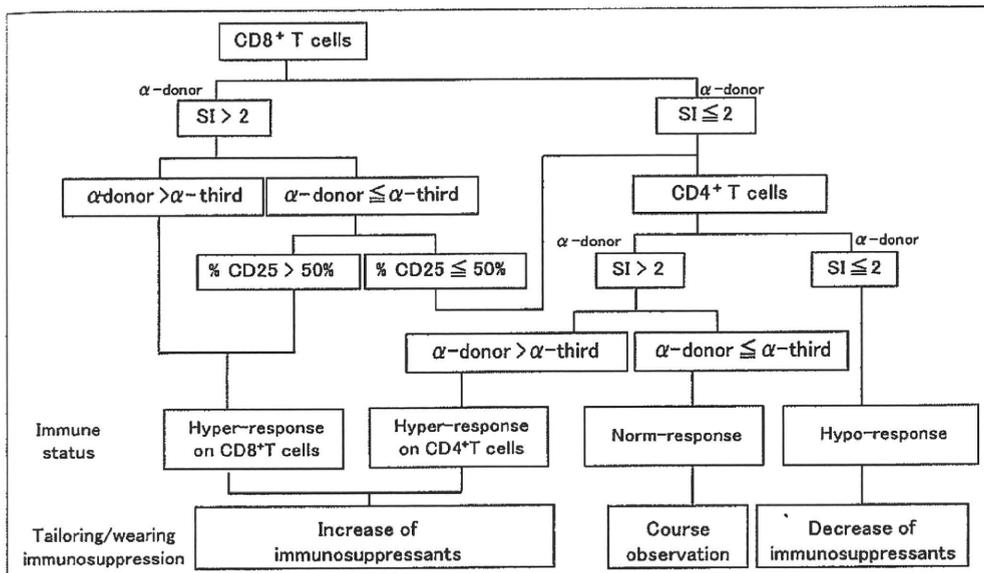


図3 免疫抑制薬の最適化のアルゴリズム

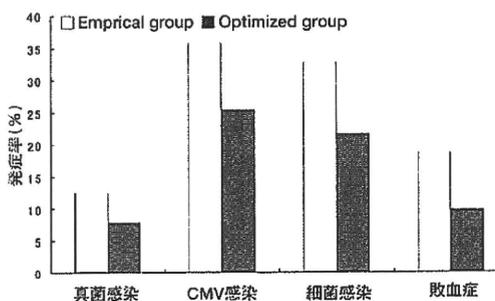


図4 免疫モニタリングの有用性試験  
対象は生体肝移植 115 例(2002 年 1 月~08 年 12 月)

2 以上と 2 未満にわけて分類します。そして、抗ドナー応答と抗 third-party 応答の優位性を判定し、免疫学的に四つのカテゴリーに分類して免疫抑制薬を増減しています。

2002 年 1 月~08 年 12 月までに行われた生体肝移植 115 例のうち、リンパ球混合試験によって 51 例に免疫抑制薬を最適しました(optimized 群)。一方、残りの症例では、通常どおり肝機能の安定をもって、徐々に免疫抑制薬を減量する empirical protocol を応用しました(empirical 群)。観察期

間中の真菌感染症の発症率、サイトメガロウイルス(CMV)感染症の発症率、細菌感染症の発症率、血流感染症の発症率は、有意差を認めないもののいずれも empirical 群にくらべ optimized 群が低値でした(図 4)。また、optimized 群は、拒絶反応も empirical 群にくらべ発症率は低く、慢性拒絶に陥った症例は認められませんでした。生存率も optimized 群のほうがやや良好でした。

免疫抑制療法最適化による功：HBV ワクチネーション

B 型肝炎は抗 HBs ヒト免疫グロブリン(HBIG)と核酸合成アナログの併用で再発予防治療が行われていますが、耐性株の出現や医療経済的に問題があり、当施設では HBV ワクチネーションを行っています。しかし、免疫抑制下において能動免疫を期待すること自体、相反する治療を行っていることとなります。必要最低限の免疫抑制による抗ドナー特異的免疫抑制状態を導くことができれば、HBV ワクチンの成功率は改善するはずで、そこで当施設では、MLR アルゴリズムによって免疫抑制薬を最少化していくと同時に、HBV

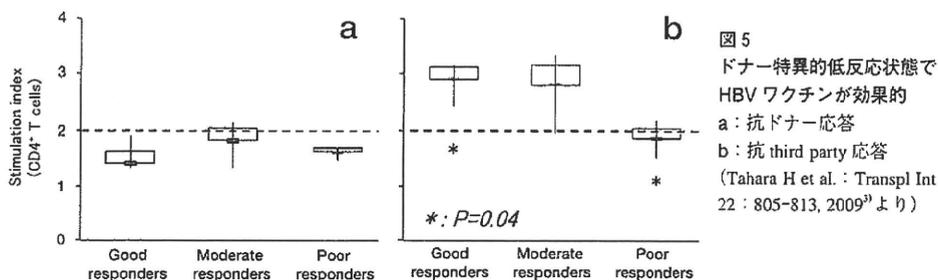


図5  
ドナー特異的低反応状態で  
HBV ワクチンが効果的  
a: 抗ドナー応答  
b: 抗 third party 応答  
(Tahara H et al. : Transpl Int  
22 : 805-813, 2009<sup>3)</sup>より)

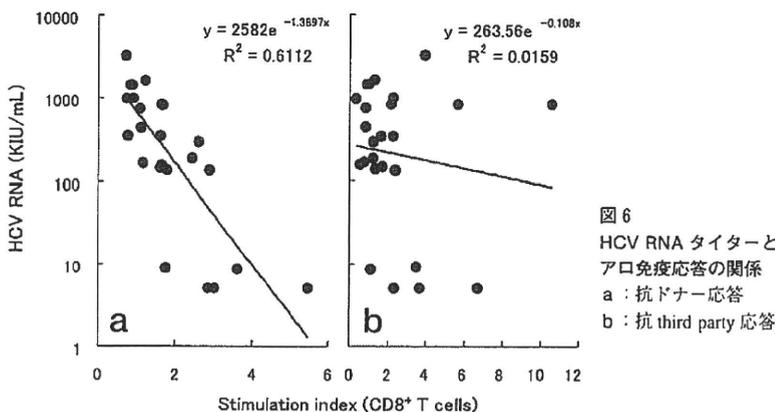


図6  
HCV RNA タイターと  
アロ免疫応答の関係  
a: 抗ドナー応答  
b: 抗 third party 応答

ワクチネーションを行っています。HBIG、ラミブジンなどの投与は併用して行い、ワクチネーションは抗体の上昇を認めるまで継続的に投与します。

ワクチネーションの成績は、1年以内に抗HBs抗体の上昇を認めたものを good responder、1~2年以内に抗HBs抗体の上昇を認めHBIGの離脱ができたものを moderate responder とすると、レスポンスした症例では抗ドナー応答は低下したままで抗 third-party 応答は正常化しています(図5)<sup>3)</sup>。すなわち、外来抗原に対しては応答できる状態であることを意味しています。一方、ワクチネーションに応答しなかった poor responder をみると、抗ドナー応答も抗 third-party 応答も、いずれも低下したままであることがわかります。免疫抑制薬の最適化ができていない症例では、ワクチンの効率も不良であることが予測されます。

当施設のHBVワクチネーションの成功率、すなわちHBIGと核酸合成アナログの離脱率は

65%です。従来の報告例からすると良好な成績です。

#### 免疫抑制療法の最適化による功：HCV免疫細胞療法

つぎに、免疫モニタリングによって明らかとなったC型肝炎に関わる重要な現象について紹介します。C型肝炎患者の末梢血中のRNA titerとMLRで測定したアロ免疫応答の推移をプロットしました。両者の関係をみてみると、抗ドナー応答の stimulation index が高ければHCV量が減り、強い逆相関が観察できます(図6)。しかし、抗 third-party 応答との関係はほとんど認められず、非特異的免疫抑制状態がHCVに対する免疫応答を抑制するのではなく、拒絶反応自体がHCVの増幅を抑制する可能性が示唆されます。

私たちはつぎのような仮説を立てました。肝移植後に拒絶反応が惹起されると、門脈流域にリンパ球が浸潤します。CD4<sup>+</sup>T細胞からはIL-2が、CD8<sup>+</sup>T細胞からはIFN $\gamma$ がリリースされます。

IL-2 産生細胞の近傍にナチュラルキラー(NK)細胞が存在すれば、そこから IFN $\gamma$  が産生され、近傍の hepatocyte 中の HCV の増幅を抑制するというものです。

そこで、つぎのような *in vitro* スタディを行いました。ダブルチャンバー・カルチャーシステムの下層に HCV レプリコン細胞を培養し、その上層でリンパ球混合試験を行いました。リンパ球混合試験が HLA の 0-mismatch、すなわち alloimmune response が起きない状態をコントロールとして HCV 増勢の程度を比較すると、3-mismatch で培養すると有意に HCV のレプリケーションが抑制され、6-mismatch で培養するとさらなる抑制効果が認められました。この培養系に IFN $\gamma$  ブロッキング抗体を添加すると、抑制効果は消失してしまいます。したがって、拒絶反応が惹起されたときにリリースされる IFN $\gamma$  が HCV の増幅を抑制しているといえます。HCV を制御するために拒絶反応を起こしつばなしにすることは現実的ではないので、組織傷害を起こすことなく、いかに肝グラフトに IFN $\gamma$  産生細胞を集めるかが、治療戦略となりえます。

私たちが考えた戦略は、肝臓に内在する NK/NKT 細胞は拒絶反応を惹起しない細胞ですが、これを直接 IL-2 で活性化して抗ウイルス効果を誘導しようというものです。ヒト肝リンパ球を採取して、NK/NKT 細胞を分離して、ダブルチャンバーシステムで培養してみると、期待どおり NK/NKT 細胞に強い抗 HCV 効果の誘導が観察できました。

また、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた実験を行いました。UPA トランスジェニック・スキッドマウス、すなわち、肝不全・免疫不全マウスにヒトの肝細胞を移植すると、90%以上がヒト肝細胞

に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが作成できます。C 型肝炎感染血清を注入すると C 型肝炎感染マウスが作製され、ここに肝由来ヒト NK/NKT 細胞を注入すると HCV は消失することが観察できました<sup>4)</sup>。

これらの基礎実験を踏まえて、ドナー肝由来活性化 NK/NKT 細胞療法を開発しました。肝移植時に肝臓を摘出して臓器灌流を行います。この廃液には NK/NKT 細胞が豊富に存在します。これを IL-2 と CD3 抗体の存在下で 3 日間培養して、レシピエントに点滴静注する治療法です。

7 例の C 型肝炎患者にこの治療法を行ったところ、2 例で HCV が消失しました。この 2 例は移植前の HCV-RNA が比較的低く、一方、高い症例では効果が認められていません。本療法を行わなかったコントロール群と比較すると、本療法を行った群は有意に HCV-RNA 量が移植後 4 週間以内では低下していることがわかります。しかし、7 例中 2 例とその確率は低く、いかに移植前の HCV を低下させるか、あるいは投与するリンパ球数を増加させるかが今後のテーマになります。

## 文 献

- 1) Tanaka Y et al. : Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol Invest* 33(3) : 309-324, 2004.
- 2) Tanaka Y et al. : Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation : immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation* 79(9) : 1262-1267, 2005.
- 3) Tahara H et al. : Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transpl Int* 22(8) : 805-813, 2009. Epub 2009 Mar 17.
- 4) Ohira M et al. : Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 119(11) : 3226-3235, 2009.

## ■ 読 書 ■

宮川 どなたか質問はございますか。

古川 大段先生の発表された免疫モニタリングの手法は、煩雑で時間がかかり、なにか事象が起きたときには治療が追いつかない可能性があります。

す。拒絶反応が起きたとき、通常は肝生検を行い、その日に結果が出て治療に移りますが、そういった場合、どういう選択をされますか。

大段 私たちは事象が起きたときに MLR をし

ているのではなく、移植後2週間おきに定期的にMLRをしています。その間になにかあったとしても、その前のMLRの結果が参考になります。

古川 理想的には、大段先生がおっしゃるようにMLRをしながら拒絶反応をその時点で抑えられればいいのですが、なにか事象が出てきたときは対応が難しいと感じました。

大段 MLRの結果を待っていれば治療が間に合わない拒絶反応はきわめて強いものです。この場合、4日の培養を待たずに細胞分裂が肉眼的にも観察できるようになります。その段階で、フローサイトメーターで解析をして判断しています。常に5日間の培養が必要ではなく、強い拒絶反応は3日ほどで判定ができます。翌日に結果の出る肝生検のテンポには追いつかないかもしれません。

古川 そういうときはどちらを重視しますか。

大段 拒絶反応かどうかという判定は、組織診よりも免疫モニタリングを重視しています。

古川 それならば効率的ではありませんか。

大段 そうですね。ウイルス性肝炎に対する肝移植例では、拒絶反応なのか肝炎再発なのか、早期では組織学的にも鑑別しにくい症例も経験しているので、免疫抑制薬を増量するか減量するかという指標としては、免疫モニタリングを用いています。

古川 拒絶反応の発現率は差が出ましたが、それをもっと下げられる可能性はありますか。

大段 いまの段階では、免疫モニタリングによってリアルタイムに免疫調整をしているというよりは、移植後早期は一般的な減量プロトコルを行い、退院後に免疫モニタリングによって免疫抑制薬をどれくらいまで減量できるか判断しています。

古川 長期だといいいのですが、急性期をどのよ

うに乗り切るかが問題だと思いましたので、質問させていただきました。

ワクチン療法においては、late responderでは反応が抗ドナー応答と抗third-party 応答とも高かったですね。

大段 Good responderでは抗ドナー応答は低く、抗third-party 応答だけが回復しています。Poor responderは両方とも抑制されています。

古川 1年以内に反応するのがearly responderですか。

大段 そうです。

古川 それが、抗ドナー応答は低くて抗third-party 応答は同じくらいですが、1年以上経って反応するものは両方とも同じくらいであると。

大段 時期の差はありますがMLRで判定される免疫状態とワクチンに対するレスポンスの関係は同等です。

古川 抗third-party 応答には同じように反応しているのに、なぜワクチン治療の成績はわるいのでしょうか。

大段 呈示したデータはHBVワクチネーションに成功したときのMLRのデータです。1~2年の間にワクチネーションに成功した症例は最適化に時間がかかっていると理解していただければと思います。免疫抑制薬の最適化に時間がかかる症例は、拒絶反応を経験しているとかそれなりの理由があるので、そういった症例では最適化までに時間がかかってしまいます。

古川 C型肝炎については、いつもながらすばらしい結果なので、大段先生にはもっと研究を推し進めていただきたいです。

武富 C型肝炎の治療については、プロトコルでは肝移植直後にリンパ球を入れて、自然免疫を検討されていますが、たとえば採取したNK/NKT細胞をある一定期間ストックしておいて、IFN+リバビリン併用療法時に使用する、または、末梢血のNK/NKT細胞を代用して使用するということが可能でしょうか。また、そのときの相乗効果をどう予想されますか。

大段 その方向で検討しています。ヒト肝細胞キメラマウスを使った実験でもウイルス量が低け

#### 発言者

- 宮川 眞一 (信州大学医学部外科)(司会)  
古川 博之 (旭川医科大学外科学講座消化器病態外科学分野)  
大段 秀樹 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学)  
武富 紹信 (九州大学大学院消化器・総合外科)  
猪股 裕紀洋 (熊本大学小児外科・移植外科)

れば、リンパ球療法で完全にウイルスを消失しえますが、ウイルス量が多いとリンパ球を移入しても効果が認められません。肝移植時も、ウイルス前値が低ければ活性化リンパ球療法1回でウイルスが消失しています。そういう意味では、IFN治療を行いつつ、ウイルス量を減少させて、リンパ球療法を併用するというのは理論的で、凍結保存してIFNと同時に使用するという試みをしようという方向でいます。

末梢血中のリンパ球を培養して免疫細胞療法に使用する発想については、100ccの末梢血からリンパ球を分離して4週間培養すると40倍ほどのNK細胞が採取できます。これを繰り返し投与するプロトコルの確立を目指しています。

武置 肝臓を摘出すると、HCVもボトムネックでかなり下がります。そのタイミングに合わせて培養リンパ球を入れていると考えていいのでしょうか。

大段 移植後3日に移入しているので、HCVは少し戻りはじめている時期かもしれませんし、もしかするとHCV消失症例では、ボトム時にリンパ球が移入されたのかもしれませんが、リアルタイムにウイルス量を観察していませんので、今後は免疫細胞移入のタイミングを図るための観察が必要です。

宮川 移植後の肝機能異常の場合、C型肝炎再発か拒絶反応かの判断が難しく、私たちも肝組織でHCVをFISH法によって測定しHCVの増殖をみましたが、拒絶反応とHCVの増殖はオーバーラップしている症例が多くありました。

拒絶反応が起こるくらいの免疫状態であればHCV増殖を抑制できるという点について、私たちの結果からみると、肝内で実際に起こっていることは非常に複雑だと思いますが、どうお考えでしょうか。

大段 ご指摘のように、拒絶反応とHCV量の相互作用は複雑である可能性はあります。拒絶反応によって産生されたIL-2が肝炎を誘導している可能性もあります。

宮川 ドナーのリンパ球をIL-2で活性化して

入れるのは1回だけですか。

大段 いまのところ1回だけです。

宮川 リンパ球には寿命があるので、繰り返し入れるというお考えはありますか。

大段 今後は末梢血中から増殖したNK細胞を細胞療法に使用したいと考えています。先ほど、末梢血中リンパ球を4週間培養するとNK細胞が40倍ほどになるとお話ししましたが、その40倍の培養細胞には強い抗HCV効果が認められました。つまり、肝臓内のNK細胞と同等の抗HCV効果は誘導できます。しかし、生体に投与した場合の細胞寿命が短縮することが今後の課題です。

宮川 MLRで免疫反応をご覧になっていますが、フォローアップ症例をずっとみていくのですか。

大段 50数例に行いましたが、入院中は2週間間隔で、退院後は3カ月から半年間隔でMLRを行い、その数値を参考にして免疫抑制薬を増減しています。

宮川 CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞の割合は、長期的にはどのように変わるのでしょか。

大段 長期ではCD8<sup>+</sup>T細胞の応答は徐々に消失して、CD4<sup>+</sup>T細胞の応答が残存する症例で肝機能障害が認められることがあります。その場合は、CNIを調整することが多くあります。CD8<sup>+</sup>T細胞の応答が長期まで残るのはまれです。

猪股 この戦略を用いての実際の免疫抑制の修飾方法ですが、CNIとステロイドについては発表されましたが、代謝拮抗薬のMMF等を加えることに関してはどうでしょうか。武器としてもCNIとステロイドだけでいこうと考えているのか、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞によってこういう状況であれば代謝拮抗薬も加えるといった具体的な方法があるのでしょうか。

大段 本来、免疫抑制療法はCNIとステロイドの二剤併用ですが、腎機能障害あるいは糖尿病などでCNIを減量する必然のある症例では代謝拮抗薬を併用しています。その場合には、代謝拮抗薬を維持して、CNIを最適化しています。

宮川 ありがとうございます。

## Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients

Hiromi Abe<sup>1,2,3</sup>, Hidenori Ochi<sup>1,2,3</sup>, Toshiro Maekawa<sup>1,2</sup>, C. Nelson Hayes<sup>1,2,3</sup>, Masataka Tsuge<sup>3,4</sup>, Daiki Miki<sup>1,2,3</sup>, Fukiko Mitsui<sup>1,2,3</sup>, Nobuhiko Hiraga<sup>1,2,3</sup>, Michio Imamura<sup>1,2,3</sup>, Shoichi Takahashi<sup>1,2,3</sup>, Waka Ohishi<sup>3,5</sup>, Koji Arihiro<sup>6</sup>, Michiaki Kubo<sup>7</sup>, Yusuke Nakamura<sup>7,8</sup>, Kazuaki Chayama<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Digestive Diseases, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Hiroshima, Japan; <sup>2</sup>Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; <sup>3</sup>Liver Research Project Center, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; <sup>4</sup>Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, Hiroshima, Japan; <sup>5</sup>Department of Clinical Studies, Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima, Japan; <sup>6</sup>Department of Pathology, Hiroshima University Hospital, Hiroshima, Japan; <sup>7</sup>Laboratory for Genotyping Development, RIKEN Center for Genomic Medicine, Yokohama, Japan; <sup>8</sup>Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

**Background & Aims:** A common genetic variation at the IL28 locus has been found to affect the response of peg-interferon and ribavirin combination therapy against chronic hepatitis C virus (HCV) infection. An allele associated with a favorable response (rs8099917 T), which is the major allele in the majority of Asian, American, and European populations, has also been found to be associated with spontaneous eradication of the virus.

**Methods:** As no studies have yet analyzed the effect of the polymorphism on biochemical and inflammatory changes in chronic infection, we analyzed a cohort of patients with chronic hepatitis C ( $n = 364$ ) for the effect of the IL28 polymorphism on viral, biochemical, and histological findings.

**Results:** We found that the proportion of HCV wild type core amino acids 70 and 91 was significantly greater ( $p = 1.21 \times 10^{-4}$  and 0.034) and levels of gamma-GTP significantly lower ( $p = 0.001$ ) in patients homozygous for the IL28 major allele. We also found that inflammation activity and fibrosis of the liver were significantly more severe in patients homozygous for the IL28 major allele ( $p = 0.025$  and 0.036, respectively). Although the higher gamma-GTP levels were also associated with higher inflammatory activity and fibrosis, multivariate analysis showed that only the IL28 allele polymorphism, sex, alcohol consumption, and liver fibrosis were independently associated with gamma-GTP levels ( $p = 0.001$ , 0.0003, 0.0013, and 0.0348, respectively).

**Conclusions:** These results suggest that different cytokine profiles induced by the IL28 polymorphism resulted in different biochemical and inflammatory conditions during chronic HCV infection and contribute to the progression of liver diseases.

© 2010 Published by Elsevier B.V. on behalf of the European Association for the Study of the Liver.

### Introduction

Hepatitis C virus infection is one of the major causative agents of chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma [1]. The best current therapeutic regimen is pegylated interferon and ribavirin combination therapy [2,3]. Although the eradication rate of the virus has been improved by extending the treatment period from the standard 48 to 72 weeks for genotype 1b infected patients, active viral replication still remains in nearly half of these patients [4].

Recent studies have identified both host and viral factors predictive of interferon therapy. Among the viral factors, a forty amino acid stretch in the NS5 region has been found to be predictive of response to interferon monotherapy [5,6]. More recently, Akuta et al. identified amino acid substitutions in the core region (core aa70 and 91) that are predictive for the effect of interferon and ribavirin combination therapy [7,8].

Among the host factors, many common polymorphisms in the human genome, including single nucleotide polymorphisms (SNP), have been identified [9–13]. We recently reported that a SNP in the MAPKAP3 gene is associated with response to interferon therapy [14]. More recently, three groups of researchers found that several SNPs in the IL28 locus are related to the effectiveness of combination therapy [15–17]. We also performed a genome wide association study and confirmed that variation at the IL28 locus is related to the effectiveness of combination therapy (Chayama K, personal communication).

Keywords: IL28; SNP; Histological activity; Inflammation; gamma-GTP.

Received 23 November 2009; received in revised form 9 March 2010; accepted 29 March 2010; available online 31 May 2010

\* Corresponding author at: Department of Medical and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate school of Biomedical Science, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan. Tel.: +81 82 257 5190; fax: +81 82 255 6220.

E-mail address: chayama@hiroshima-u.ac.jp (K. Chayama).

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; SNP, single nucleotide polymorphism; ISDR, interferon sensitivity determining region; BMI, body mass index.



ELSEVIER

## Research Article

These viral and host factors must influence the natural course of viral infection. Host immune cells produce interferon and other cytokines in response to viral infection. For RNA viruses such as HCV, cellular sensors such as RIG-I detect the double stranded RNA and activate a pathway to produce cytokines, including alpha and beta interferons that trigger an antiviral response to eradicate the virus [18]. Genetic polymorphism of genes involved in innate immunity is likely to influence the strength and nature of this defense. In fact, a polymorphism in the IL28 locus has been reported to correlate with spontaneous eradication of HCV [19]. However, little is known about how these factors affect the course of chronic infection of the virus. In this study, we focused on histological findings in the liver. We also analyzed viral and biochemical factors in patients chronically infected with HCV. We found that histological aspects of the liver (fibrosis and activity), HCV core amino acid substitutions, and gamma-GTP are associated with the polymorphism.

### Materials and methods

#### Study subjects

We analyzed a cohort of 364 consecutive adult patients with chronic hepatitis C virus infection who visited Hiroshima University hospital and received liver biopsies between December 2002 and November 2008 and who agreed to provide blood samples for the human genome study. All patients included in the study had positive HCV viremia in serum for more than six months, assessed using a commercial quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay (COBAS Amplicor HCV Monitor Test, v2.0; Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). Patients with decompensated liver disease were excluded, as were patients co-infected with hepatitis B virus, or human immunodeficiency virus and patients with apparent auto-immune hepatitis and alcoholic liver disease. All patients provided written informed consent for the genomic analysis. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved *a priori* by the ethical committees of Hiroshima University and Riken. The patient profiles are listed in Table 1. Using criteria reported by Desmet et al. [20], liver biopsy samples were evaluated by two pathologists. To verify consistency and accuracy, one of the pathologists independently re-evaluated samples analyzed by the other, and both

**Table 1. Characteristics of patients.**

| Characteristics of patients                                      |                         |
|--|-------------------------|
| Age [median (range)]   | 59 (20–82)              |
| Sex (male/female)  | 212/152                 |
| BMI [median (range)]   | 23 (16–39)              |
| Alcohol consumption<br>(Unavailable/none/0–20 g/day/21–50 g/day) | 64/110/65/125           |
| Hb [median (range)] mg/dl  | 14 (8–18)               |
| Platelet [median(range)] × 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>      | 14 (4–41)               |
| ALT [median (range)]IU/L   | 62 (2–611) <sup>c</sup> |
| gamma-GTP [median (range)] IU/L                                  | 50 (7–680)              |
| Genotype (1b/2a or 2b/1b + 2b/undetermined)                      | 260/84/1/19             |
| Fibrosis (F0/F1/F2/F3/F4)  | 4/116/141/66/37         |
| Activity (A0/A1/A2/A3)   | 1/102/206/51            |
| Virus titer [median (range)]kIU/l                                | 1400 (<0.5–26,000)      |
| Core 70 <sup>a</sup> (wild/mutant/undetermined)                  | 120/77/167              |
| Core 91 <sup>a</sup> (wild/mutant/undetermined)                  | 107/88/169              |
| ISDR <sup>b</sup> mutation (0/1/>2/undetermined)                 | 58/70/48/188            |

<sup>a</sup> Hepatitis C virus core amino acid 70R and 91L are presented as wild type. Substituted amino acids are considered mutants.

<sup>b</sup> Interferon sensitivity determining region. Number of amino acids substituted from the prototype genotype 1b sequence were calculated.

<sup>c</sup> ALT levels of two patients remained around 2 IU/L even though AST and gamma-GTP levels were comparable to other chronic hepatitis C patients (peaking above 100 IU/L and returning to normal following SVR), probably due to deficiency of the ALT enzyme. These values were omitted from analysis of ALT.

pathologists were blind with respect to the IL28 polymorphism. We excluded insufficient or inconclusive biopsy samples, including those that were less than 10 mm<sup>2</sup> in size and containing less than 10 portal tracts. The amount of alcohol consumed was calculated according to the frequency of consumption and the alcohol concentration of beverages consumed. We estimated alcohol concentrations as follows: 5% for beer, 17% for sake, 25% for Japanese vodka, and 43% for whiskey; 1 ml of alcohol was considered equivalent to 0.886 g. The amount of alcohol consumed was divided into three categories: none, light (0–20 g/day), moderate (21–50 g/day). Heavy drinkers (more than 50 g/day) were excluded from the study.

#### Genotyping

Genotyping of some of the samples was performed as part of a genome wide association study using the Illumina HumanHap610-Quad Genotyping BeadChip (Illumina, Inc., CA) at Riken Yokohama Institute. Genotyping of the remaining samples was performed using TaqMan assay or Invader assay as described previously [21,22].

#### Analysis of amino acid sequences in the core and ISDR region

HCV RNA was extracted from 100 µl serum samples by SepaGene RV-R (Sanko Junyaku Co., Tokyo, Japan) and dissolved in 20 µl of H<sub>2</sub>O. The RNA was then reverse transcribed with random primers and MMLV reverse transcriptase (Takara Shuzo, Tokyo, Japan). The resultant cDNA was then amplified by nested PCR. PCR was performed in 25 µl of reaction mixture containing 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM of each dNTP, 20 pmol of each primer and 1.25 U of LA Taq (Takara Bio Inc.) with a buffer supplied by the manufacturer. One microliter of 10×-diluted products from the first PCR was used as a template for the second PCR. The PCR primer sequences are listed in Table 2. The PCR protocol involved initial denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, annealing of primers for 1 min at 57 °C and extension for 1 min at 72 °C, followed by final extension at 72 °C for 7 min. The amplified DNA fragments were separated onto a 2% agarose gel and purified with the QJAquick gel extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Nucleotide sequences were determined using the Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., CA). The obtained nucleotide and amino acid sequences were compared with the prototype sequence of genotype 1b HCV-1 (GenBank Accession Number D90208) [23]. Amino acids at positions 70 and 91 of the core region that were identical to the prototype (arginine and leucine, respectively) were considered wild type.

#### Statistical analysis

$\chi^2$  and Mann–Whitney U-tests were applied to detect significant associations. Simple and multiple regression analyses were used to examine the association between serum gamma-GTP levels and the values of other markers. When the data were not normally distributed, Box-Cox power transformation was performed to remove skewness, followed by linear regression analyses. All of the statistical analyses were two sided, and  $p < 0.05$  was considered significant. All statistical analysis was performed using the PASW Statistics 18 program (SPSS Inc., IL).

### Results

#### IL28 locus genotypes and viral and biochemical markers

We compared viral and biochemical markers with IL28 genotypes. First we analyzed the relationship between IL28 genotypes

**Table 2. Primers used in this study.**

| Core region       |                                      |
|-------------------|--------------------------------------|
| Outer forward     | 5'-GCC ATA GTG GTC TGC GGA AC-3'     |
| Outer reverse     | 5'-GGA GCA GTC CTT CGT GAC ATG-3'    |
| Inner forward     | 5'-GCT AGC CGA GTA GTG TT-3'         |
| Inner reverse     | 5'-GGA GCA GTC CTT CGT GAC ATG-3'    |
| ISDR <sup>a</sup> |                                      |
| Outer forward     | 5'-TTC CAC TAC GTG ACG GGC AT-3'     |
| Outer reverse     | 5'-CCC GTC CAT GTG TAG GAC AT-3'     |
| Inner forward     | 5'-GGG TCA CAG CTC CCA TGT GAG CC-3' |
| Inner reverse     | 5'-GAG GGT TGT AAT CCG GGC GTG C-3'  |

<sup>a</sup> Interferon sensitivity determining region.

**Table 3. Amino acid substitutions in the core region of HCV and IL28 genotype.**

| SNP           | Allele (1/2) | Genotype |    |     | p value <sup>a</sup> | OR (95% CI) <sup>b</sup> |
|---------------|--------------|----------|----|-----|----------------------|--------------------------|
|               |              | 11       | 12 | 22  |                      |                          |
| rs8099917 T/G | Core aa70    |          |    |     |                      |                          |
|               | Wild         | 2        | 17 | 101 | 1.21E-04             | 0.30                     |
|               | Non-wild     | 3        | 28 | 46  |                      | (0.14–0.55)              |
|               | Core aa91    |          |    |     |                      |                          |
|               | Wild         | 3        | 18 | 86  | 0.034                | 0.50                     |
|               | Non-wild     | 2        | 27 | 59  |                      | (0.26–0.95)              |
|               | ISDR         |          |    |     |                      |                          |
|               | 0–1          | 2        | 37 | 89  | 0.120                | 1.90                     |
|               | >2           | 2        | 7  | 39  |                      | (0.84–4.3)               |
|               | HCV genotype |          |    |     |                      |                          |
|               | 1            | 6        | 63 | 190 | 0.443                | 0.81                     |
|               | 2            | 1        | 25 | 58  |                      | (0.47–1.4)               |

<sup>a</sup> p value by  $\chi^2$  test for the minor allele dominant model.  
<sup>b</sup> Odds ratio for the minor allele in a dominant model.

and substitutions in the HCV core protein amino acids 70 and 91, as well as the HCV genotype and the number of amino acid substitutions in the ISDR. As shown in Table 3, there are significant associations between amino acid substitutions in the core region and the genotype of the rs8099917 SNP at the IL28B locus. In particular, patients homozygous for the major IL28 allele were significantly associated with wild type core amino acid 70 (OR = 0.30;  $p = 1.21E-04$ ). A similar trend is seen with core amino acid 91 substitutions (OR = 0.50;  $p = 0.034$ ). Patients with more than one amino acid substitution in the ISDR region also tended to occur in patients homozygous for the major allele, although the difference was not statistically significant (Table 3). There was no correlation between the HCV genotype and the IL28 allele.

We further examined the relationship between IL28 and biochemical markers such as ALT, gamma-GTP, total cholesterol, HDL cholesterol, serum iron, and HCV RNA levels. Only the gamma-GTP level was significantly associated with the IL28 genotype. As shown in Fig. 1A, the gamma-GTP levels were lowest in the IL28 major allele homozygotes and highest in minor allele homozygotes. As drinking alcohol is known to elevate gamma-GTP levels, we examined the effect of alcohol intake in

**Table 4. Factors associated with higher gamma-GTP levels.**

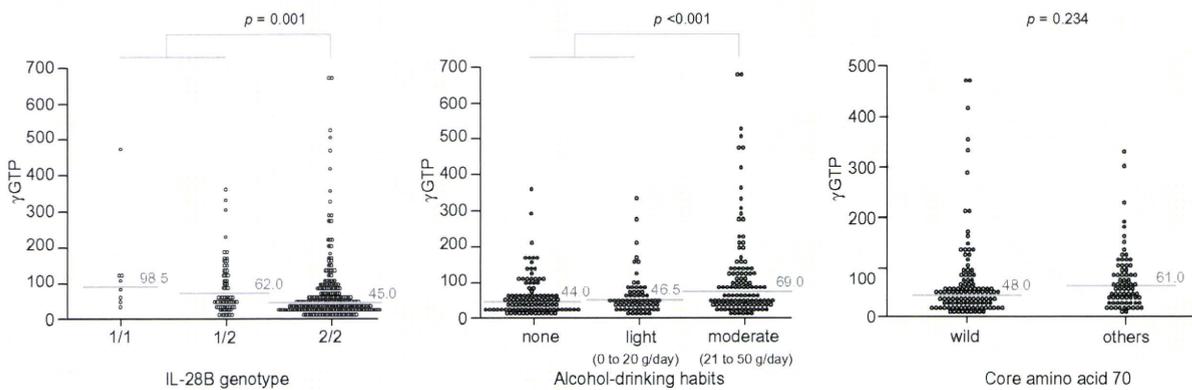
| Variable                         | Simple   |          | Multiple |        |
|----------------------------------|----------|----------|----------|--------|
|                                  | Estimate | p        | Estimate | p      |
| Age                              | -0.00004 | 0.899436 |          |        |
| Sex (male vs. female)            | 0.04647  | 5E-09    | 0.033    | 0.0003 |
| BMI                              | -0.00257 | 0.044003 |          |        |
| Activity (A2–4 vs. A0–1)         | -0.02518 | 0.004103 | -0.015   | 0.1415 |
| Fibrosis (F2–4 vs. F0–1)         | -0.03    | 0.000382 | -0.021   | 0.0348 |
| Alcohol consumption              | -0.03962 | 6.81E-06 | -0.029   | 0.0013 |
| IL28 genotype (2/2 vs. 1/2, 1/1) | 0.02641  | 0.003522 | 0.03     | 0.001  |
| HCV genotype (1 vs. 2)           | -0.0068  | 0.471293 |          |        |
| Log virus titer (Log IU/ml)      | 0.00032  | 0.748826 |          |        |
| Core aa70 (wild vs. others)      | -0.01589 | 0.117424 |          |        |
| Core aa91 (wild vs. others)      | -0.01422 | 0.162341 |          |        |
| ISDR (0–1 vs. $\geq 2$ )         | 0.00253  | 0.824685 |          |        |

Simple and multiple regression analyses were used to examine the association between serum gamma-GTP and the values of other markers. All of the statistical analyses were two sided, and  $p < 0.05$  was considered significant.

our cohort. As shown in Fig. 1B, there was an association between alcohol and gamma-GTP levels. As we found that the gamma-GTP level is higher in patients with core amino acid 70 substitutions (Fig. 1C), we performed multivariate analysis to examine what factors contribute to higher levels of gamma-GTP. As shown in Table 4, a simple regression analysis revealed that serum gamma-GTP levels were associated with sex, BMI, inflammation activity, liver fibrosis, alcohol consumption, and IL28 genotype, whereas in multiple regression analysis, sex, liver fibrosis, alcohol consumption, and IL28 genotype remained positively associated with serum gamma-GTP levels.

*Histological findings and polymorphism in the IL28 locus*

We then analyzed the relationship between the IL28 locus polymorphisms and histological findings. We divided patients into mild fibrosis (F0 and F1) and severe fibrosis (F2–4) as well as lower activity (A0 and A1) and higher activity (A2 and A3) and compared these factors against IL28 genotypes. As shown in Table 5, both inflammatory activity and fibrosis were significantly associated with IL28 genotype. Inflammation was more active (A2–3) in patients homozygous for IL28 major alleles



**Fig. 1. gamma-GTP levels and IL28 genotype, alcohol intake, and core amino acid substitutions.** gamma-GTP levels according to (A) IL28 genotypes, (B) alcohol consumption, and (C) core amino acid 70 substitutions are shown. Horizontal bars represent the median. Mann–Whitney U-test was used to compare gamma-GTP levels.

## Research Article

**Table 5. Histological findings and IL28 genotypes.**

| SNP       | Allele (1/2) | Genotype |    |     | p value <sup>a</sup> | OR<br>(95% CI) <sup>b</sup> |
|-----------|--------------|----------|----|-----|----------------------|-----------------------------|
|           |              | 11       | 12 | 22  |                      |                             |
| rs8099917 | T/G          |          |    |     |                      |                             |
|           | Fibrosis     |          |    |     |                      |                             |
|           | F0-1         | 3        | 38 | 79  | 0.036                | 1.66                        |
|           | F2-4         | 5        | 53 | 186 |                      | (1.03-2.69)                 |
|           | Activity     |          |    |     |                      |                             |
|           | A0-1         | 2        | 35 | 68  | 0.025                | 1.75                        |
|           | A2-3         | 6        | 56 | 199 |                      | (1.07-2.86)                 |

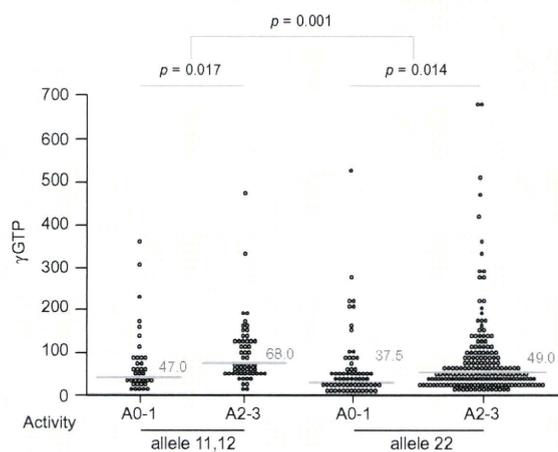
<sup>a</sup> p value by  $\chi^2$  test for the minor allele dominant model.

<sup>b</sup> Odds ratio for the minor allele in a dominant model.

(OR = 1.75;  $p = 0.025$ ). Similarly, fibrosis was more severe in patients homozygous for IL28 major alleles (OR = 1.66;  $p = 0.036$ ). We also performed analysis of the association of IL28 alleles and histological findings after adjusting for other factors that might influence the activity and fibrosis of the liver, such as age, gender, and alcoholic consumption. The IL28 allele was associated with F and A factors independently with adjustment for these predictive factors related to severity of liver fibrosis and inflammation (data not shown).

#### Relationship between histological activity, the IL28 allele, and gamma-GTP

As we described above, histological activity is more active in patients homozygous for IL28 major alleles. However, it seems contradictory that IL28 major allele homozygosity was associated with low levels of gamma-GTP, but severe activity was associated with high gamma-GTP. As shown in Fig. 2, however, when we compare the allele and activity the frequency of patients with higher activity (A2 and A3) were statistically more frequent in patients homozygous for major alleles (Fig. 2 and Table 5). When we compare gamma-GTP levels of A2 and A3 patients between patients homozygous for major alleles against the others, the lev-



**Fig. 2. Relationship between gamma-GTP levels, histological activity and IL28 genotype.** gamma-GTP levels are plotted according to IL28 alleles, and histological activity. Horizontal bars represent the median. Mann-Whitney U-test was used to compare gamma-GTP levels.

els were significantly lower in the major allele homozygous patients (Fig. 2). A0 and A1 patients showed similar results (Fig. 2), gamma-GTP levels are also significantly higher in patients with higher activities (A2 and A3) than in patients with lower activities (A0 and A1) (Fig. 2).

#### Discussion

Polymorphism at the IL28 locus has been reported to be associated with the effectiveness of interferon and ribavirin combination therapy [15-17]. We have also found that the polymorphism is associated with the effect of interferon monotherapy on genotype 1b infected patients as well as genotype 2a infection in Japanese as well as Taiwanese patients (Chayama K, personal communication). The polymorphism has also been reported to be associated with spontaneous eradication of the hepatitis C virus [19]. As levels of IL28 gene transcripts have been reported to be higher in patients homozygous for the interferon response allele [16,17], we hypothesized that the polymorphism is also associated with inflammation and progression of chronic hepatitis. As expected, there were significant associations between IL28 genotypes and histological inflammatory activity as well as the degree of fibrosis in chronically HCV infected patients (Table 5). It seems reasonable that the inflammation is stronger in patients with elevated IL28 production because this molecule induces expression of interferon stimulated genes, including some inflammatory cytokines. As the polymorphism is associated with the effect of interferon therapy, the interferon therapy performed before biopsy might alter the results. In fact, a part of patients in this study were treated with peg-interferon and ribavirin combination therapy and the treatment outcome was associated with IL28 genotypes and core amino acid substitutions (data not shown). However, when we analyzed the relation between the IL28 allele and histological findings or core amino acid substitutions in only treatment-naïve patients, the results were unchanged, suggesting that the results obtained in this study are applicable without regard to history of interferon therapy.

Interestingly, the IL28 genotype was also associated with gamma-GTP levels and core amino acid substitutions, both of which are known to be predictive of response to interferon and ribavirin combination therapy [7,8,24]. The levels of liver enzymes such as ALT, AST, and gamma-GTP are usually higher in patients with high inflammatory activity. However, we observed that the levels were actually lower in patients with the favorable allele at the IL28 locus (the major allele in the Japanese population) (Figs. 1A and 2). A lower level of gamma-GTP has been reported to be associated with positive response to combination therapy. Further studies are needed to clarify the mechanism underlying the relation between gamma-GTP levels and therapy effectiveness. It would also be interesting to study the relationship between the IL28 allele and steatosis in the liver because gamma-GTP tends to be elevated in patients with steatosis, and steatosis caused by HCV core protein has been reported [25].

Similarly, viral wild type core amino acids 70 and 91 (i.e., core 70R and 91L), which were already known to be associated with positive response to combination therapy [7,8], were also found to be associated with the favorable human IL28 alleles (Table 3). If viruses with wild type core amino acids 70 and 91 are more

susceptible to interferon therapy, such strains should be less frequent in patients with higher cytokine levels. Viruses with wild type core 70 and 91 amino acids must therefore have some survival advantage in order to replicate in cells in which the level of IL28 production is high. Searching for a target molecule in the signaling cascade from sensing of the virus to production of IL28 might help resolve this question.

We also observed an association between high gamma-GTP levels and core amino acid 70 and 91 substitutions (Fig. 1C), although in multivariate analysis only IL28 genotype, liver fibrosis, sex, and alcohol consumption were significant predictors of gamma-GTP. It seems likely that these factors mutually interact in the presence of the virus and cytokines. Understanding these relationships will reveal the mechanism underlying the effective response to combination therapy and may suggest new strategies to cope with the hepatitis C virus.

#### Financial disclosure

The authors who have taken part in this study declare that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

#### Acknowledgments

The authors thank Rie Akiyama, Yoshie Yoshida, Kazuyo Hattori, Mariko Shiota, Hiromi Ishino, Yasufumi Hayashida, and Takako Yokogi for excellent technical assistance, and Junko Sakamiya, Aya Furukawa, Mika Tsuzuno, Sakura Akamatus, Sanae Furuya, and other secretary members for their secretarial assistance. Part of this work was carried out at the Analysis Center of Life Science, Hiroshima University. This work was supported in part by Grants-in-Aid for scientific research and development from the Ministry of Health, Labor, and Welfare and Ministry of Education Culture Sports Science and Technology, Government of Japan.

#### References

- [1] Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, Gil C, Celis R, Gil MP, et al. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 1995;21:639–644.
- [2] Hadziyannis SJ, Sette Jr H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346–355.
- [3] 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 randomized trial. *Lancet* 2001;358:958–965.
- [4] Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandao-Mello CE, et al. Re-treatment of patients with chronic hepatitis C who do not respond to peginterferon-alpha2b: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009;150:528–540.
- [5] Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. 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] Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995;96:224–230.
- [7] Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, et al. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 2007;46:403–410.
- [8] Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, et al. Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. *J Med Virol* 2006;78:83–90.
- [9] Welzel TM, Morgan TR, Bonkovsky HL, Naishadham D, Pfeiffer RM, Wright EC, et al. Variants in interferon-alpha pathway genes and response to pegylated interferon-Alpha2a plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus infection in the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology* 2009;49:1847–1858.
- [10] Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the MxA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with the response of hepatitis C patients to interferon. *Intervirology* 2000;43:124–127.
- [11] Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, et al. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* 2003;4:411–419.
- [12] Matsuyama N, Mishiro S, Sugimoto M, Furuichi Y, Hashimoto M, Hijikata M, et al. The dinucleotide microsatellite polymorphism of the IFNAR1 gene promoter correlates with responsiveness of hepatitis C patients to interferon. *Hepatol Res* 2003;25:221–225.
- [13] Naito M, Matsui A, Inao M, Nagoshi S, Nagano M, Ito N, et al. SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2005;40:381–388.
- [14] Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, et al. A polymorphism in MAPKAPK3 affects response to interferon therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2009;136:1796–1805, e1796.
- [15] Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461:399–401.
- [16] Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009;41:1100–1104.
- [17] Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009;41:1105–1109.
- [18] Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730–737.
- [19] Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798–801.
- [20] Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19:1513–1520.
- [21] Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J Hum Genet* 2001;46:471–477.
- [22] Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidyl-larginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003;34:395–402.
- [23] Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9524–9528.
- [24] Bergmann JF, Vrolijk JM, van der Schaar P, Vroom B, van Hoek B, van der Sluis Veer A, et al. Gamma-glutamyltransferase and rapid virological response as predictors of successful treatment with experimental or standard peginterferon-alpha-2b in chronic hepatitis C non-responders. *Liver Int* 2007;27:1217–1225.
- [25] Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998;4:1065–1067.