

恵会医科大学附属青戸病院、東京大学、東京労災病院、東芝病院、東北大学、徳島市民病院、虎の門病院、富山大学、名古屋医療センター、能代山本医師会病院、兵庫県立西宮病院、福岡赤十字病院、藤元早鈴病院、北海道大学、南和歌山医療センター、宮崎大学、名鉄病院、山梨大学、和歌山医療センター

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1.学会発表

- 1)酒井明人他:C型慢性肝炎に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)併用ペグインターフェロン・リバビリン療法の適応 JDDW2011 シンポジウム10 福岡 2011.10
- 2) 酒井明人他:C型慢性肝炎に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)併用インターフェロン療法の有効性 第46回日本肝臓学会総会、山形、2010.5
- 3) 酒井明人他:1型高ウイルス量C型慢性肝炎に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)併用ペグインターフェロン・リバビリン療法の現況 JDDW2010 横浜、パネルディスカッション、2010.10

2. 論文発表

- (1) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 141: 128-140.
- (2) Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 139: 499-509.
- (3) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M,

Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics* 2009; 41: 1105-1109 .

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

総合分担研究報告書

C型肝硬変に対する生体肝移植に関する研究に関する研究

研究分担者 谷口雅彦 旭川医科大学外科学講座 消化器病態外科学分野 講師

研究要旨：

C型肝硬変に対する生体肝移植は移植後のC型肝炎の再発のため、その成績は満足しうるものではなく、移植後の抗HCV療法の効果も低い。これらを克服すべく我々は、①移植後早期からの再発予防療法、②Double filtration plasma pheresis (DFPP)併用療法、さらには③免疫抑制剤としてより抗HCV効果を示すサイクロスポリンへの変更療法を施行した。次にこれらの結果に基づき④宿主側、ウイルス側因子の検討を通して肝移植症例における抗HCV治療抵抗因子の解明を行った。その結果から、成績を向上させるためには、治療抵抗性を示す症例に対する治療法を検討する必要があると考え、⑤治療抵抗性を示す症例に対する新たな抗HCV療法の試みを行った。そしてそれらの結果を基に⑥C型肝硬変に対する肝移植前後のオーダーメイド治療の確立を検討した。

- ① 移植後のC型肝炎再発予防療法の効果はSVRが27.3%、治療中断率は26.9%であり、従来の報告同様に満足しうるものではなかった。
- ② 抗HCV療法施行時のHCV-RNA量を減少させる目的で13例においてDouble filtration plasma pheresis (DFPP)を併用した。再発予防策としてのDFPP併用療法は、一時的なウイルス減少には寄与するものの、効果は一時的であることから、継続したウイルス量の低下、SVRを得るためにはDFPP後の継続した抗ウイルス療法が重要であると考えられた。一方FCHに対しては効果がある可能性が高かった。
- ③ 抗HCV療法無効例5例に対して免疫抑制剤をタクロリムスからサイクロスポリンに変更した。サイクロスポリンはC型肝炎症例に対して線維化を抑制する傾向があったが、C型可燃再発を抑制、あるいは軽減させることはできなかった。
- ④ 治療に影響する因子を検討したところ、移植前のHCV-RNAが低値であるもの、aa70番のコアアミノ酸置換がwild typeであるものがSVRを得られやすい傾向を認めた。一方、レシピエントのIL28Bの遺伝子多型はSVRに影響を与えるものではなかったが、ドナー側を考慮する必要があると考えられた。
- ⑤ 治療抵抗性を示した症例7例に対してFluvastatin併用療法を施行した。3例でウイルス量の低下傾向を示し、うち1例がPeg IFN+RBV療法中止後もウイルス量は現在検出限界以下であった。またFluvastatinの効果認めなかった4例のうち、2例はPeg IFNをalfa-2bから2aに変更し、現在までウイルス量は検出限界以下となっている。同様に1例はPeg IFN alfa-2aからIFN-beta+DFPP療法に変更し、ウイルス量の漸減を認めた。

以上の結果から、宿主側、ウイルス側の因子が移植後の抗HCV療法に影響を与えることを考慮し、①移植前にウイルス量を減少させる対策を講じ、②移植後にはドナーとレシピエントの宿主側・ウイルス側因子の組み合わせから抗HCV療法の効果を予測し、③治療抵抗性である症例に対しては積極的にFluvastatin等の併用療法や、IFNの変更等の多角的治療戦略を講ずることにより、成績向上が期待できると考えられた。これらを加味したテーラーメイド治療は有効性が期待でき、今後症例を蓄積して検討すべきであると思われた。

A. 研究目的

C 型肝炎に対する肝移植では、その再発は急速かつ重篤であり、5 年生存率は非 C 型肝炎症例と比し有意に不良である。Peg-Interferon (Peg-IFN) +Ribavirin (Rib)療法 SVR も一般的に 30%前後と低く、さらに中止率も 30%前後と高い。これらを克服すべく、平成 21 年度に①移植後再発予防療法、②Double filtration plasma pheresis (DFPP)併用療法、③免疫抑制剤としてより抗 HCV 効果を示すサイクロスポリンへの変更療法の効果を検討した。平成 22 年度には前年度の結果に基づき④宿主側、ウイルス側因子の検討を通して肝移植症例における抗 HCV 治療抵抗因子の解明を行った。そして平成 23 年度は⑤治療抵抗性を示す症例に対する新たな抗 HCV 療法の試みを行い、それらの結果を基に⑥C 型肝炎に対する肝移植前後のオーダーメイド治療の確立を検討した。

B. 研究方法

1997 年 11 月から 2010 年 4 月までに北海道大学にて生体肝移植を施行した 209 例中、C 型肝炎症例 23 例に対して移植後抗 HCV 療法を施行した。

【検討 1】

移植後再発予防療法症例の成績を検討した。

【検討 2】

抗 HCV 療法開始時に HCV-RNA >6 log IU/mL の症例に対して開始日から 5 日間連続にて DFPP 療法を併用した。HCV-RNA 量の推移、肝機能の推移、合併症の発現率、SVR 率を比較検討した。さらに抗ウイルス療法難治例に対して DFPP 併用療法を施行し、その効果を検討した。

【検討 3】

抗 HCV 療法施行後 3 ヶ月の時点で HCV-RNA の減少量が 2 log IU/mL 未満の症例に対して免疫抑制剤をタクロリムスからサイクロスポリンに変更し、HCV-RNA 量の推移、肝機能の推移、臨床経過、肝生検による病理組織学的結果を変更前と比較検討した。

【検討 4】

抗 HCV 療法治療効果別の genotype、ウイルス量の比較検討、治療効果別のウイルス遺伝子変異の比較検討、治療効果別の宿主側の遺伝子変異の比較検討を行っ

た。

【検討 5】

治療抵抗性を示す症例に対する IFN+ RBV+Fluvastatin 併用療法症例、IFN 変更症例の成績を検討した。

【検討 6】

以上の結果を基に、C 型肝炎に対する移植前後のオーダーメイド治療の確立を検討した。

C. 研究結果

【検討 1】

C 型肝炎症例の累積 5 年生存率は 60.2%であり、非 C 型肝炎症例の 76.1%と比し、有意差はないものの低い傾向にあった。23 例中、C 型肝炎関連死を 4 例に認めた。SVR は 6 例、26.1%に認められた。治療抵抗性にて治療継続した症例は 7 例(30.4%)存在した。

【検討 2】

C 型肝炎再発予防療法として DFPP 併用療法を行った 10 例中、DFPP が完遂できた症例は 6 例、副作用・合併症にて中断した症例は 4 例であった。完遂できた 6 例において、DFPP 5 日間施行後、引き続き HCV-RNA 量の減少を認めたものが 2 例、一旦は減少したもののその後再上昇を認めたもの 2 例、DFPP 施行後速やかにウイルス量が上昇し、5 日間終了時に全くウイルス量の低下を認めなかったものを 2 例認めた。それらの結果、SVR は 1 例、HCV-RNA 量が持続して低値であった症例(治療前より 2 log IU/mL 以下の減少)2 例、再上昇を 2 例認めた。さらに IFN の副作用(甲状腺機能亢進症)にて IFN 療法中断した症例が 1 例存在した。他方、DFPP 併用療法を施行しなかった症例は 12 例あり、内 SVR を 5 例で認めた。再発後治療として DFPP 併用療法を行ったものは 3 例であった。2 例は FCH に対して、1 例は IFN 療法施行中の高ウイルス状態に伴う肝機能上昇に対して DFPP 併用療法を施行した。3 例中 1 例は上記の如く FCH にて失ったが、1 例は HCV-RNA 量の減少とともに肝機能が改善、また 1 例は FCH の状態からも離脱し、救命し得た。

【検討 3】

5 例中 SVR 症例は認めなかったが、1 例において HCV-RNA 量が 3 log IU/mL 以上の減少を認めた。さらに、組織学的検討では 5 例中 3 例において F 因子の一段階改善を認めた。しかしいずれの症例も継続した臨床

病理学的改善は認めなかった。1 例において急性拒絶反応が誘発されたと考えられた。

【検討 4】

全 23 例を SVR 群 (6 例)、非 SVR 群 (17 例) に分け、2 群間で genotype、移植前後の HCV-RNA 量、genotype 1b におけるコアアミノ酸置換、ISDR 変異数、IL28B 遺伝子多型を比較した。genotype 2 型は SVR 群の 33.3% に対し非 SVR 群は 6.7% と低い傾向にあるものの有意差は認めなかった ($p=0.1087$)。移植前後の HCV-RNA 量は移植前にて SVR 群が有意差を持って低かったが ($p=0.031$)、移植後は両群間に差は認めなかった。genotype 1b においては、コアアミノ酸置換に関して aa70 番が wild type であるものは SVR 群において 75% であるのに対し、非 SVR 群は 14.2% と有意差を持って SVR 群において wild type が高い傾向が示された ($p=0.029$) が、aa91 番に関しては両群間に変異に有意差は認めなかった。同様に ISDR 変異数 2 以上の症例数も両群間に有意な差は認めなかった。さらに宿主側因子である IL28B の変異においても major allele の出現率は両群間において差はなかった。一方 genotype 1b 症例における SVR 率を宿主側、ウイルス側の背景因子別に検討したところ、aa 70 番が wild type であるものが、有意に多かったが ($p=0.0149$)、aa 91 番、ISDR 変異数、IL28B 変異に関しては特異な変化は認めなかった。しかしながら、SVR 症例において、個々の宿主側因子、ウイルス側因子を検討したところ、genotype 1b 症例においてレシピエントの IL28B が hetero type であるものが 3 例存在し、特に aa70 番、91 番とも mutant かつ ISDR 変異もなく、かつ IL28B も hetero type であるにも関わらず、SVR を得られている症例が 1 例存在した。これらはドナー側の因子が抗ウイルス効果に影響を与えている可能性が示唆された。

【検討 5】

これまでの抗 HCV 療法治療抵抗性症例 7 例に対して Fluvastatin 併用療法を施行した。7 例中 3 例において、HCV-RNA の低下を認めた。内 1 例は Fluvastatin 併用にて、HCV-RNA 量は検出限界以下となった。7 例中 3 例にて Fluvastatin 併用下に IFN を変更し、内 2 例 (Peg IFN alfa-2b→2a) で HCV-RNA 量は漸減し、検出限界以

下となり、1 例 (Peg IFN alfa-2b→IFN beta +DFPP) も現在まで低下傾向を示している。

【検討 6】

昨年度のウイルス側・宿主側因子の研究結果、さらには本年度の治療抵抗性症例の検討から、

- ① 移植後の治療のみでは不十分であり、移植前から HCV-RNA 量を低下させる治療が必要である。
- ② 移植後はウイルス側因子としてコアアミノ酸置換子等を考慮すべきであり、また宿主側因子として IL28B 遺伝子多型はレシピエント側因子と共にドナー側の因子も考慮すべきである。
- ③ さらに治療抵抗性を示す症例に対しては、Fluvastatin 併用、あるいは IFN 変更療法を積極的に行っていくべきである。

以上の結果を得たことからこれらを踏まえて、移植前後のテーラーメイド治療の模式図を作成した (図 1)。

D. 考察

我々の生体肝移植後の成績は SVR、5 年生存率ともに従来の報告に比し同様のものであった。

生体肝移植後の C 型肝炎再発予防策として DFPP 併用療法は一時的にウイルス量を下げる効果はあるものの、その後の効果は一定ではない。すなわち継続したウイルス量の低下を得るためには DFPP 後の継続した抗ウイルス療法が重要である。

サイクロスポリンへの変更療法に関しては C 型肝炎症例に対して線維化を抑制する傾向があったが、C 型可燃再発を抑制、あるいは軽減させることはできなかった。それに関しては症例数が少ないため、今後さらなる症例の蓄積・検討が必要である。

以上の結果を踏まえて、抗 HCV 療法に影響を与える因子として宿主側、ウイルス側の因子を検討した。検討結果から、特に HCV-RNA 量が移植後の治療成績に影響を及ぼすことを考慮すると、移植後の治療のみでは不十分であり、移植前から HCV-RNA 量を低下させる治療が必要であることが窺えた。また移植後はウイルス側因子としてコアアミノ酸置換子等を考慮すべきであり、また宿主側因子として IL28B 遺伝子多型に関しては、最近の報告にも見られるようにレシピエント側因子と共にドナー側の因子も考慮すべきである。

生存率に関しては、他施設同様、初期の症例と最近の症例を比較すると、近年その成績は向上している。しかし依然としてSVRが低く、治療抵抗性を示す症例は肝硬変→肝不全になる現状がある。これらの成績を今後向上させるためには、治療抵抗性を示す症例に対する治療法を検討する必要がある。それに対し、本年度の結果は移植後の免疫抑制状態下でも Fluvastatin が慢性肝炎症例同様に効果を示すことを示唆しており、今後症例を増やしてさらに検討するべきであると思われた。同様に従来の IFN 無効例に対し IFN の変更が有効であったことから、移植後の抗 HCV 療法に対し抵抗性を示す症例に対しては積極的に IFN を変更すべきであり、治療抵抗性症例でも抗 HCV 療法を組み合わせることにより、ウイルスを排除することが可能となり、結果的に予後の改善にも繋がることが期待された。

以上の結果を加味したテラーメイド治療は有効性が期待でき、今後症例を蓄積して検討すべきであると思われた。

E. 結論

肝移植後の抗 HCV 療法は宿主側、ウイルス側の因子が影響を与えることを考慮し、移植前にウイルス量を減少させる対策を講じ、移植後にはドナーとレシピエント双方の宿主側、あるいはウイルス側因子の組み合わせから抗 HCV 療法の効果を予測することが重要であり、他方治療抵抗性である症例に対しては積極的に Fluvastatin 等の併用療法や IFN の変更など、多角的治療戦略を講ずることにより、成績向上が期待できると考えられた。これらを加味したテラーメイド治療は有効性が期待でき、今後症例を蓄積して検討すべきであると思われた。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1.学会発表

- 1) 谷口雅彦、古川博之、嶋村 剛、鈴木友己、山下健一郎、藤堂 省:生体肝移植後 C 型肝炎再発に対する治療戦略 Apheresis 学会, 札幌 2009
- 2) 谷口雅彦、渡辺正明、大浦 哲、山下健一郎、鈴木友己、嶋村 剛、古川博之、藤堂 省「成人間生体肝

移植におけるグラフト選択の検討」第 110 日本外科学会、名古屋、2010

3) Taniguchi M, Watanabe M, Ohura T, Shimamura T, Suzuki T, Yamashita K, Furukawa H, and Todo S. Regulation of splanchnic circulation for small for size graft in living donor liver transplantation 16th ILTS, Hong Kong, 2010

4) 谷口雅彦、嶋村 剛、鈴木友己、山下健一郎、古川博之、藤堂 省「成人間生体肝移植におけるグラフト選択の検討」第 28 回 日本肝移植研究会、広島、2010

5) 谷口雅彦、渡辺正明、藤好真人、大浦 哲、嶋村剛、鈴木友己、山下健一郎、古川博之、藤堂 省「成人間生体肝移植における門脈循環調節の検討」第 17 回 日本門脈圧亢進症学会、富山、2010

6) Taniguchi M, Watanabe M, Oura T, Yamashita K, Suzuki T, Shimamura T, Furukawa H, Todo S. Portal flow modulation in adult to adult living donor liver transplantation. 第 8 回日韓移植フォーラム、京都、2010

7) 谷口雅彦、永生高広、大浦 哲、渡辺正明、鈴木友己、山下健一郎、嶋村 剛、古川博之、藤堂 省「成人間生体肝移植における門脈圧調節の意義」第 18 回 門脈圧亢進症学会 2011 年 9 月 15 日 福岡

8) 谷口雅彦、「肝移植から学んだこと」第 94 回 旭川臨床画像・IVR 研究会 旭川、2011

2. 論文発表

1) 谷口雅彦、古川博之、嶋村 剛、鈴木友己、山下健一郎、藤堂 省(総説)脳死肝移植:肝臓 51(4): 143-162,2010

2) Uchida K, Taniguchi M, Shimamura T, Suzuki T, Yamashita K, Ota M, Kamiyama T, Matsushita M, Furukawa H, Todo S: Three-Dimensional computed tomography scan analysis of hepatic vasculatures in the donor liver for living donor liver transplantation. Liver Transplantation 16(9): 1062-1068,2010

3) Nagatsu A, Taniguchi M, Shimamura T, Suzuki T, Yamashita k, Kawakami h, Abo D, Kamiyama T, Furukawa F, Todo S Endoscopic naso-pancreatic drainage for the treatment of pancreatic fistula occurring after living donor liver transplantation. World Journal of Gastroenterol.; 17(30):3560-4.; 2011

- 4) 谷口雅彦、古川博之、唐崎秀則、今井浩二、永生高広、藤田 智、大浦 哲、渡辺正明、山下健一郎、鈴木友己、嶋村 剛、藤堂 省脳死下におけるドナー管理、医学のあゆみ 237, 459-465, 2011
- 5) 谷口雅彦、永生高広、古川博之：8 章 肝臓 extended criteria donor からの肝移植 マージナルドナー 丸善出版 61-35, 2011
- 6) 谷口雅彦、永生高広、唐崎秀則、今井浩二、渡邊賢二、古川博之、肝移植の現状と未来、北海道外科学会雑誌、2012 (in press)

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

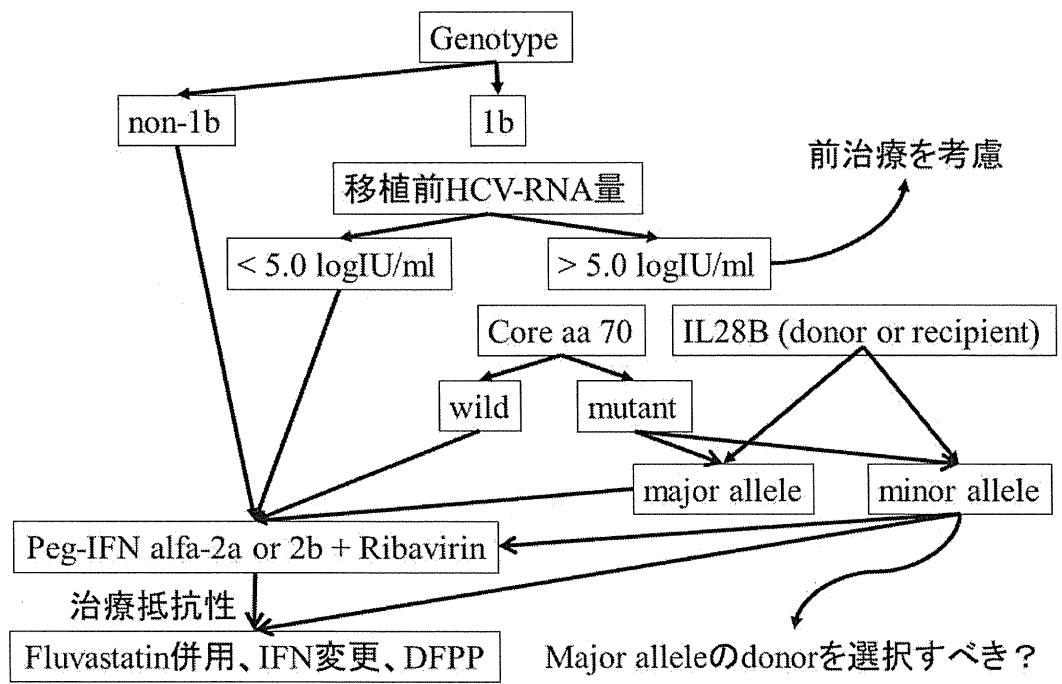


図1 抗HCV療法フローチャート

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

総合分担研究報告書

C型肝炎における新規治療法に関する研究に関する研究

研究分担者 梅村武司 信州大学医学部消化器内科 講師

研究要旨; 遺伝子型1bかつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者では、PEG-IFN/RBV 併用療法中に血中 C 型肝炎ウイルスが陰性化しない無反応例が 2 割程度存在する。このような難治性 C 型肝炎ウイルスに対する治療薬の開発には、適切な HCV 細胞培養モデルによる解析が重要である。さらに、PEG-RBV 併用療法治療前に治療効果予測も重要である。本研究班では1) IFN 抵抗性の遺伝子変異を持ち、かつ遺伝子型 1b の感染性クローンを用いた HCV 細胞培養モデルの開発および改良を行い、薬物スクリーニングにおける本培養系の有用性を IFN/スタチン製剤の抗 HCV 効果から検討を行った。2) 治療前血清の各種サイトカイン、IL-28B SNP (rs8099917)、コア変異を用いて無効例の治療効果予測を行った。1) 線維性胆汁うっ滞性肝炎を発症し、IFN 治療に無反応であった患者から採取された全長 HCV RNA を用い cDNA コンストラクトを作成し、T7 RNA ポリメラーゼで全長 HCV RNA を合成した。HCV RNA の NS2 に 1 カ所と NS4B に 2 カ所変異を導入し、さらに Huh7 細胞を用いて樹立した Cure 化細胞にて培養したところ、約 20 倍に感染効率が向上した。改良した培養系を用いて、IFN- α と Simvastatin による抗ウイルス効果を測定すると、IFN による抗 HCV 効果を明確に確認することが可能であった。以上より、本改良型 HCV 細胞培養モデルは、遺伝子型 1b の HCV に対する抗ウイルス効果が期待される薬物のスクリーニングに優れた実験系と考えられた。2) 多変量解析による無効に寄与する因子の解析では、IL-28B SNP(ヘテロ+マイナーアリル)、高 IL-10 値、低 IL-12 値がそれぞれ独立した因子であった。以上の結果より、IL-28B に加えて血清 IL-10、IL-12 の測定が PEG-IFN/RBV 併用療法に対する無効例の予測因子になり得ることが明らかとなった。今後プロテアーゼ阻害薬を使用する患者群に対しても有効なバイオマーカーとなり得るか検討が必要である。

共同研究者

信州大学医学部 消化器内科 田中榮司(教授)

A. 研究目的

遺伝子型1bかつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者ではPEG-IFN/RBV併用療法では治療中に血中C型肝炎ウイルスが陰性化しない無反応例が 2 割程度存在する。このような難治性 C 型肝炎ウイルスに対する治療薬開発には、適切な細胞培養モデルによる解析が重要である。本研究では IFN 抵抗性の遺伝子変異を持ち、かつ遺伝子型 1b の感染性クローンを用いた HCV 細胞培養モデルの開発および改良を行い、薬物スクリーニングにおける本 HCV 細胞培養系の有用性を IFN/スタチン

製剤の抗 HCV 効果から検討を行った。さらに、PEG-RBV 併用療法患者における無効例の治療予測因子の検索を行った。

B. 研究方法

1) 肝移植後に線維性胆汁うっ滞性肝炎(FCH)を発症し、IFN 治療が無効であった患者から採取された全長 HCV RNA (1b 4×10^7 copies/mL コア変異 70 変異型、91 野生型、ISDR 野生型、IRRDR 5 カ所)から cDNA コンストラクトを作成し、T7 RNA ポリメラーゼで全長 HCV

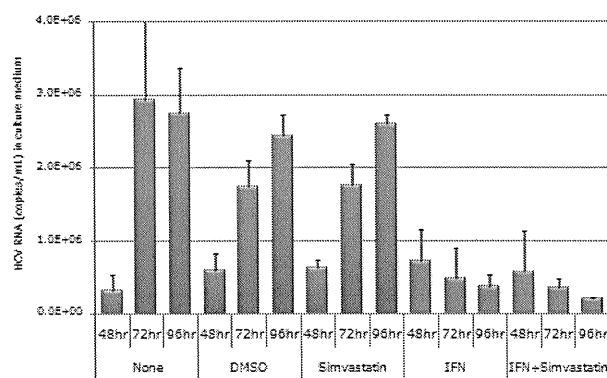
RNA を合成した。培養効率を向上させ、実験系として使用しやすいように改良するために NS2 に 1 カ所と NS4B に 2 カ所変異を導入し、さらに Huh7 細胞から Cure 化細胞の樹立を行った。最終的には改良した培養系を用いて、IFN- α 、Simvastatin による阻害実験を行った。

2) PEG-IFN /RBV 併用療法を施行した 1 型・高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者 79 例を対象とした。治療開始前、治療開始 4 週、治療終了後 24 週の保存血清を用いて、Luminex™ サイトカインアッセイシステムにて血清サイトカイン (IL-10、IL-12) を測定した。ウイルス側要因として core 領域 70 と 91 および ISDR のアミノ酸変異について解析した。52 症例については IL28B 近傍の SNP (rs8099917) を測定し、治療効果に関与する因子について検討した。

C. 研究結果

1) FCH 患者より樹立した TPF1/4B は Huh7 細胞において増殖し、培養上清中に感染可能なウイルス粒子を分泌するが、感染能力が低い。そこで、NS2 に変異導入を行った TPF1/M クローンを作成した。感染増殖はエレクトロポレーション 72 時間後の上清中 HCV コア抗原量で比較すると TPF1/4B 85 FFU/mL と比較して TPF1/M は 180 FFU/mL と 2 倍に上昇した。Cure 化細胞の樹立をするために RepTPF1 (sub-genomic replicon) を Huh7 細胞にエレクトロポレーション施行し、形成されたコロニーに IFN を添加し、sub-genomic replicon を除去して cure 化細胞を樹立した。継代を行っても感染・増殖能が変化しない Huh7-ALS32 を選択して感染実験を行うと感染増殖は Huh7 細胞と比較して約 10 倍となった。改良した培養系を用いて IFN と Simvastatin を用いて阻害実験を施行した。Simvastatin 単独投与では抗 HCV 効果は認められなかった。(図) IFN 投与群では 72 時間、96 時間後の上清中 HCV RNA 量は著明に低下しており抗 HCV 効果を認めた。IFN+Simvastatin 併用群では IFN 単独群と比較して著明な阻害効果は認めなかった。

IFN- α Simvastatin による阻害実験



2) SVR 群 (31 例) と non-SVR 群 (48 例) における治療前血清サイトカイン値の比較では、IL-12 が SVR 群で、IL-10 は non-SVR 群で有意に高値であった。血清 IL-10 はコア 70 が変異型の患者より野生型の患者で有意に高値であった ($P=0.045$)。IL28B SNPs (rs8099917) についてはメジャーアレルでは IL-10 ($P=0.01$) が低値、IL-12 ($P=0.006$) が高値であった。血清 IL-10 値と IL-28B SNPs からみた無効率は IL-28B SNP (メジャーアレル) では IL-10 高値例では低値例と比較して有意に高く (50% vs. 0%; $P=0.003$)、IL-28B SNP (ヘテロ+マイナーアレル) でも (87% vs. 0%; $P=0.001$) 同様の傾向を認めた。無効に寄与する因子について多変量解析を施行すると IL-28B SNP (ヘテロ+マイナーアレル)、高 IL-10 値、低 IL-12 値がそれぞれ独立した因子であった。

D. 考察

1) HCV クローンに変異を導入し、培養細胞として cure 化細胞を用いる事によって、当初の遺伝子型 1b の感染性クローンを用いた HCV 細胞培養モデルと比較して約 20 倍高い感染効率を持つ改良モデルを作成することに成功した。この改良モデルを用いて IFN 添加による HCV 阻害実験を施行すると、IFN の抗 HCV 効果を明確に証明でき、本 HCV 細胞培養系が遺伝子型 1b の HCV に対する抗ウイルス薬のスクリーニングに使用可能と考えられた。

2) IL28B SNP に加え、治療前血清 IL-10 および IL-12 値を測定することにより PEG-IFN+RBV 併用療法の治療無効例をより効率的に予測することが可能であった。今後はプロテアーゼ阻害薬投与される患者においても検討が必要である。

E. 結論

遺伝子型 1b の感染性クローンを用いた HCV 細胞培養系の開発および改良を行い、本培養系が 1b 型の HCV に対する抗ウイルス薬の開発に有用である可能性を示唆した。PEG-RBV 併用療法患者における治療無効との関連マーカーを明らかにした。今後プロテアーゼ阻害薬を使用する患者群に対しても有効なバイオマーカーとなり得るか検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. The 7th APASL Single Topic Conference Makuhari, Japan, December 17, 2010
- 2) 梅村武司、米田傑、松本晶博 C 型慢性肝炎の PEG-IFN/RBV 併用療法におけるサイトカイン・ケモカイン測定の意義 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 平成 22 年 10 月 14 日
- 3) 米田傑、梅村武司、上條敦、森田進、城下智、小松通治、一條哲也、松本晶博、吉澤要、田中榮司 1 型高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者における PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果とサイトカイン・ケモカインとの関連 第 46 回日本肝臓学会総会 山形 平成 22 年 5 月 27 日

2. 論文発表

- 1) Joshita S, Umemura T, Katsuyama Y, Ichikawa Y, Kimura T, Morita S, Kamijo A, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kamijo N, Ota M, Tanaka E. Association of IL28B gene polymorphism with development of hepatocellular carcinoma in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. Hum Immunol (in press)

- 2) Yoneda S, Umemura T, Joshita S, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Ota M, Tanaka E. Serum chemokine levels are associated with the outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. Hepatol Res 2011;41:587-593.

- 3) Umemura T, Joshita S, Yoneda S, Katsuyama Y, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Serum IL-10 and IL-12p40 levels and IL28B gene polymorphisms: pretreatment prediction of treatment failure in chronic hepatitis C. Antivir Ther 2011;16:1073-80.

- 4) Yoneda S, Umemura T, Katsuyama Y, Kamijo A, Joshita S, Komatsu M, Ichijo T, Matsumoto A, Yoshizawa K, Ota M, Tanaka E. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. J Infect Dis 2011; 203:1087-1095.

- 5) Umemura T, Ichijo T, Yoshizawa K, Tanaka E, Kiyosawa K. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan. Journal of Gastroenterology 2009; suppl 19:102-107.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

総合分担研究報告書

マウスモデルを用いたC型肝炎に対する新規治療法に関する研究

研究分担者 今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 助教

研究要旨: 抗 HCV 薬となり得る新規候補薬の効果あるいは新規治療法の有効性をヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討した。ME3738(ソヤサポゲノール B 誘導体)は、単独では抗 HCV 効果を認めなかったが、IFNとの併用投与より IFN 誘導遺伝子の発現を促進し、抗 HCV 効果を増強した。HCV 感染マウスに NS3/4A プロテアーゼ阻害剤あるいは NS5B ポリメラーゼ阻害剤を単独投与すると両薬剤とも抗 HCV 効果を認めるものの耐性ウイルス出現による breakthrough を発症した。しかし両剤を併用投与することにより breakthrough の予防、抗ウイルス効果の増強効果を認め、HCV の排除も可能であり、異なる HCV 蛋白を標的とする薬剤を組み合わせることにより IFN 製剤を使用せずとも HCV の排除が可能であることが示された。種々の薬剤の HCV 感染阻害効果も検討した。HIV の entry 阻害剤である Phosphorothioate oligonucleotide (PS-ON)あるいはコレステロールトランスポーターの Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1)の拮抗薬であるエザチミブを前投与することにより、マウス HCV 感染が抑制された。これらの薬剤が HCV 感染阻害剤となる可能性が示された。

A. 研究目的

ヒト肝細胞キメラマウスは肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されている。本マウスに肝炎ウイルスを投与すると、置換されたヒト肝細胞にて感染、複製が生じ、高 titer のウイルス血症が長期間継続することより、本マウスは肝炎ウイルス感染モデルとして有用である。本研究では、抗 HCV 薬となり得る新規候補薬の効果あるいは新規治療法の有効性をヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

Genotype 1b型のHCV患者血清をマウスに静脈内注射した。血中HCV titeが高値になった時点、あるいは患者血清投与前より種々の薬剤を投与することにより抗HCV効果あるいはHCV感染予防効果を検討し

た。有効性が示された以下の4種類の治療について示す。

1. 抗HCV効果の検討

1) HCV血清投与6-8週後、マウスにIFN- α (1500 IU/g/日, 連日腹腔内投与)あるいはソヤサポゲノール B 誘導体である ME3738 (1.5 mg/g feed 連日経口投与)を4週間、単独あるいは併用投与し、マウス血中HCV RNA低下量および肝臓内HCVコア抗原量を測定した。またIFN投与4時間後、肝臓内のPKR, MxA, OASなどのIFN誘導遺伝子 (ISGs) 発現量をreal-time PCRにて測定した。

2) HCV血清投与6-8週後、マウスにプロテアーゼ阻害剤(テラプレビル, 200 mg/kg, 1日2-3回, 連日経口投与)あるいはポリメラーゼ阻害剤(MK-0609, 3 mg/kg, 1日2回, 連日経口投与)を単独あるいは併用投与し、

マウス血中HCV RNA量の測定およびNS3, NS5B領域のアミノ酸配列を解析した.

2. 感染阻害効果の検討

3) Phosphorothioate oligonucleotide (PS-ON) はHIVのentryを阻害することが報告されている. JFH-1を用いた培養細胞実験により, PS-ONがHCVのentryを阻害することが示された (米国NIHとの共同研究). HCV患者血清投与前, マウスに10 mg/kg/BWのPS-ONあるいはコントロールとして非活性型の薬剤を1週間連日腹腔内投与した. HCV患者血清投与3週後にマウス血液を採取し, 血中HCV RNA量をreal-time PCRにて測定した.

4) Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1)は, 小腸粘膜に存在するコレステロールのトランスポーターであるが, 肝臓内にも多く発現する. JFH-1を用いた培養細胞実験により, NPC1L1はHCVのレセプターであり, その拮抗薬であるエゼチミブがHCVのentryを阻害することが示された (米国イリノイ大学との共同研究). HCV患者血清投与前, マウスに10 mg/kg/BWのエゼチミブあるいはコントロールとして非活性型の薬剤を2週間連日経口投与した. HCV患者血清投与1週後にマウス血液を採取し, 血中HCV RNA量をreal-time PCRにて測定した.

C. 結果

1) ME3738は, 単独ではマウス血中ウイルス量を低下させなかったが, IFN- α との併用投与により4.7 log低下させ, IFN- α 単独の1.9 log低下に比べ, 有意に強い抗HCV効果を認めた($p=0.035$). また投与4週後の肝

臓内コア抗原量はIFN- α /ME3738誘導体併用投与群で最も低かった. マウス肝臓内ISGsはIFN単独群に比べ, IFN- α /ME3738併用群において有意に高値であった. これらの結果はME3738がIFN- α のISGs誘導を促進し, 抗HCV効果を増強していることを示すものであった.

2) テラプレビルおよびMK0609投与により, マウス血中HCV RNAは著明に低下したが, いずれにおいても投与中, 耐性株(NS3領域のV36A変異, NS5B領域のS282T変異)が出現し, HCV RNAは再上昇した. テラプレビルとMK-0609を併用投与すると, さらに強力な抗HCV効果を認め, すべてのマウスにおいてウイルスは投与1週後に検出感度以下に低下した. 4週間の投与中, HCV RNAの再上昇を認めず, 観察した投与終了18週後まで血中ウイルス陰性が持続し, PCRにより肝臓内にもHCVは検出されず, おそらく完全排除されたものと思われた.

3) HCV血清投与前, 非活性型PS-ONを投与した群では, 7頭すべて(100%)で血中HCVの陽性化を認めたのに対し, PS-ON投与群では7頭中1頭(14%)のみが陽性となった($p=0.001$). この結果は, 生体内においてもPS-ONがHCVの感染を抑制することが示すものと思われた.

4) HCV血清投与前, 非活性型のエゼチミブ投与群ではHCV投与1週後, 5頭すべて(100%)において血中HCVの陽性化を認めたのに対し, エゼチミブ投与群では7頭中2頭(29%)のみが陽性となった($p=0.013$). この結果は, 生体内においてもエゼチミブがHCVの感染を抑制することを示すものと思われる.

D. 考察

ME3738は比較的安全性の高い薬剤であり、IFN難治性の症例にadd onすることにより、治療効果を高めることが期待される。異なるHCV蛋白を標的としたDAA製剤を組み合わせることにより、IFN製剤を使用せずともウイルスの排除が可能であることを見いだした。またPS-ONあるいはエゼチミブは、HCVの感染阻害効果を有しており、生体肝移植後のHCV再感染予防などに期待される。またエゼチミブの作用するNCP1L1はHCVのレセプターである可能性があり、ワクチン開発のターゲットとなり得ると思われる。

E. 結論

HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて種々の薬剤の抗ウイルス効果を検討した。ME3738がIFNの治療効果を増強すること、異なるHCV蛋白を標的としたDAA製剤を組み合わせることにより、IFN製剤を使用せずともウイルスの排除が可能であることを見いだした。またPS-ONあるいはエゼチミブがHCVの感染阻害剤になり得る可能性を見いだした。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1

cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 18; 281-5, 2012.

・ Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both *in vitro* and *in vivo*. *J Hepatol* 55(1); 11-8, 2011

・ Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice. *J Hepatol* 54(5); 872-8, 2011

・ Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical Evaluation of a Mouse with Chimeric Human Liver Model for Hepatitis C Virus Infection Using an NS3-4A Protease Inhibitor. *J Gen Virol* 2010;91:1668-7

・ Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Zhang YY, Imamura M, Hiraga N, Juteau JM, Cosset FL, Chayama K, Vaillant A, Liang TJ. Amphipathic DNA Polymers Inhibit Hepatitis C Virus Infection by Blocking Viral Entry. *Gastroenterology* 137 (2); 673-81, 2009

2. 学会発表

・ 今村道雄, 平賀信彦, 茶山一彰. HCV 感染マウスを用いた NS3/4A protease 阻害剤および NS5B polymerase 阻害剤併用療法の有用性の検討. 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 平成 22 年 10 月 14 日.

・ 平賀伸彦, 今村道雄, 阿部弘美, 柘植雅貴, 高橋祥一, 茶山一彰. ME3738 は細胞および動物モデルにおいて IFN の抗 HCV 効果を増強する. 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 平成 22 年 10 月 14 日.

・ 今村道雄, 越智秀典, 茶山一彰. 宿主およびウイルス因子からみた 1b 高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対する治療方針. 第 15 回日本肝臓学会大会 福岡 平成 23 年 10 月 21 日.

・ Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H and Chayama K. The influences of viral mutations on HCV infectivity, replication ability and the susceptibility to interferon in human hepatocyte chimeric mice. The 7th

APASL Single Topic Conference, Chiba, December 17-18, 2010

・ Imamura M, Abe H, Hiraga N, Tsuge M, Takahashi S, C. Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Impact of Viral Amino Acid Substitutions and Host IL28B polymorphism on Replication and

Susceptibility to Interferon of Hepatitis C Virus. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

・ Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi T, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Rapid Emergence of Telaprevir Resistant Hepatitis C Virus Strain From Wild Type Clone in Vivo. 12th AASLD, San Francisco. November 4, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

総合分担研究報告書

C型慢性肝炎に対する新規治療薬の治療成績

研究分担者 瀬崎ひとみ 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 肝臓センター

研究要旨; Genotype 1b、高ウイルス量の C 型慢性肝炎症例に対する Pegylated Interferon (PEG-IFN)と Ribavirin (RBV)併用療法にフルバスタチンナトリウム(ローコール®)を併用した 3 者併用療法は、NVR 例が減少したことにより 72 週投与の SVR 率は、全体で 68%、50 歳以上の女性でも 71%と高率となった。新規治療薬である Telaprevir と PEG-IFN+RBV の 3 者併用 24 週治療の SVR 率は、初回治療例では 76%、PEG-IFN+RBV 再燃例では 90%、無効例は 27%と著明に向上したが、*IL28B*が TG/GG であると、HCV core 70 番のアミノ酸置換の有無により治療成績に有意差を認めた。同様に NS5A 阻害剤(BMS-790052)と PEG-IFN+RBV24 週併用療法では、SVR 率は初回治療例が 67%(6/9)、前治療無効例が 25%(2/8)であった。*IL28B*が TG の症例は治療中に HCV RNA が再燃する例があり、SVR 率が低率となった。NS5A 阻害剤(BMS-790052)+NS3 阻害剤(BMS-650032)24 週併用療法は、SVR 率は初回治療例が 58%(7/12)、前治療無効例が 91%(10/11)であった。*IL28B* genotype、HCV core70 番の変異の有無によっては、最終的な SVR 率に差は認めなかった。より副作用の少ない抗 HCV 薬の出現が望まれており、さらには内服のみで HCV を制御可能となれば、より多くの症例に治療の機会が与えられるものと期待される。

A. 研究目的

従来難治性とされてきた genotype1 型、高ウイルス量症例に対する Pegylated Interferon (PEG-IFN)と Ribavirin (RBV)併用療法の治療成績を向上させるための試みとして、HMG-CoA 還元酵素阻害剤の併用を行ってきた。さらに、ウイルスタンパクをターゲットとした NS3-4A protease 阻害剤である Telaprevir が認可されたことにより、治療成績は飛躍的に向上することが期待される。さらに、より副作用を軽減するために NS5A 阻害剤等の抗 HCV 薬を併用するという試みも並行して行われてきた。そこでこれら HMG-CoA 還元酵素阻害剤の併用療法および新規治療薬併用療法の治療成績を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

虎の門病院において、Genotype 1b 型、高ウイルス量の C 型慢性肝炎症例に対し PEG-IFN と

RBV の 48 週間の併用療法にローコール®を併用し、治療開始後 48 週以上経過した 98 例で 3 者併用療法中の治療時期別陰性化率および 48 週治療、72 週治療の SVR 率を検討した。

また、Telaprevir (MP-424)と PEG-IFN+RBV 併用療法 24 週間投与(T12PR24; Telaprevir と PEG-IFN+RBV 併用療法 12 週間投与しその後 PEG-IFN+RBV 併用療法 12 週間を継続)を施行した症例 61 例において、その治療成績とウイルス側(HCV core 領域 70 番と 91 番目のアミノ酸変異の有無、ISDR のアミノ酸変異数)および宿主側の因子(*IL28B* genotype;rs8099917)との関係について検討した。

さらに、NS5A 阻害剤 (BMS-790052)と PEG-IFN+RBV24 週併用療法を施行した 17 例および NS5A 阻害剤(BMS-790052)+NS3 阻害剤 (BMS-650032)24 週併用療法を施行された 23 例における治療中のウイルス動態と最終的な治療

効果について、ウイルス因子(HCV core 領域の 70 番目のアミノ酸変異の有無)および宿主因子 (*IL28B* genotype;rs8099917)との関係を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、副作用、患者に関する個人情報、守秘義務、患者の権利保護等について説明し同意を文章または口頭にて取得し研究を行った。

C. 研究結果

(1) PEG-IFN+RBV とローコール®併用治療中のウイルス累積陰性化率

対象 98 例の背景は、男性 49 例、女性 49 例、年齢は 26-70 歳(中央値 55 歳)であった。初回治療例が 70 例、前治療再燃例が 12 例、前治療無効例が 16 例であった。全例のウイルス累積陰性化率は、12 週目 40%、24 週目 73%、48 週目 85%であった。このうち、治療中 HCV-RNA が陰性化しなかった NVR 例は、治療中止例も含め 22 例(22.4%)であった。

男女別、年齢別にみると、男性は 50 歳未満と 50 歳以上で累積陰性化率に差は認めず、それぞれ 12 週目 50%、50%、24 週目 93%、75%、48 週目 93%、78%であった。これに対し、女性は 50 歳未満に比し 50 歳以上で有意に陰性化時期が遅く、それぞれ 12 週目 46%、24%、24 週目 85%、57%、48 週目 100%、81%という結果であった(Log Rank=0.031)。

48 週治療終了後の効果判定可能な症例は 33 例であった。このうち、治療開始後 12 週以内に陰性化した症例は 12 例、13 週以降に陰性化した症例は 3 例であり、NVR 例は 18 例であった。12 週以内に陰性化した症例のうち、10 例(83%)が SVR となった。これを男女別、年代別にみると、50 歳未満の男性および女性はいずれも 100%、50 歳以上の男性は 75%と高率に SVR に至ったが、50 歳以上の女性は 50%のみであった。

72 週治療終了後の効果判定可能な症例は 32 例であった。著効に至ったのは 21 例(66%)であっ

た。陰性化時期別にみると、8 週目陰性化例は 4/4(100%)、12 週目陰性化例は 6/7(86%)、13 週以降は 11/21(52%)であった。50 歳以上の女性のみで検討すると、12 週以内に陰性化した症例は 3 例全例が SVR となっており、13 週以降に陰性化した症例も 4/10(40%)が SVR に至り、全体では 8/14(57%)が SVR となった。

(2) Telaprevir (MP-424)と PEG-IFN+RBV 併用 24 週の治療成績

61 例の内訳は初回治療例 17 例、PEG-IFN+RBV 再燃例 29 例、無効例(NVR)15 例であった。これらの SVR 率は、初回治療例では 76%、PEG-IFN+RBV 再燃例では 90%、無効例は 27%であった。宿主因子である *IL28B* とウイルス因子である core70 番のアミノ酸変異の組み合わせから SVR 率をみると、*IL28B* が TT の場合は core の変異の有無により治療効果に差は認めず、core70 番が wild で 92%、mutant で 100%と高率であったが、TG/GG となると core70 番が wild の場合は 64%であるのに対し、mutant の場合は 21%と治療効果に有意差を認めた。

(3) NS5A 阻害剤 (BMS-790052) と PEG-IFN+RBV24 週併用療法の治療経過と成績

17 例の内男性 7 例、女性 10 例、年齢中央値 61 歳、初回治療例 9 例、PEG-IFN+RBV 無効例 8 例であった。前治療の有無によりそれぞれ NS5A 阻害剤は 60mg/日と 10mg/日の比較を行った。naïve 症例は、10mg 群の 1 例が 12 週目に HCV RNA が 2 log₁₀ 低下に至らなかった(NVR)ため治療中止となったほかは、いずれも 6 週以内に HCV RNA の陰性化を認めた。10mg 群の中で RBV を減量し、RBV adherence が 50%台であった症例が 2 例あり、この症例は治療終了後再燃したが、その他の 6 例(67%)は SVR となった。PEG-IFN+RBV 無効例は、各群の 1 例ずつが NVR であった他は、治療開始前に NS5A の耐性変異を有していた症例も含め 6 週以内に HCV RNA は陰性化を認めたが、治療中 breakthrough および治療後再燃を来し、SVR に至ったのは各群 *IL28B* TG、HCV core mutant の 1 例ずつのみ

(25%)であった。全例で HCV core 70 番のアミノ酸変異および *IL28B* genotype 別に治療効果をみると、SVR 率は core70 番が wild は 56%、mutant は 38%で有意差には至らなかった。さらに TT/wild の 6 症例は治療終了時 HCV RNA は 100%陰性化しており、SVR 率も 83%と高率であったが、TG/wild の 3 例、TG/mutant の 8 症例は、治療中 breakthrough を来したり、治療後再燃することにより、SVR 率はそれぞれ 0%、38%と低率であった。

(4) NS5A 阻害剤(BMS-790052)+NS3 阻害剤(BMS-650032)24 週併用療法の治療経過と成績

23 例中男性 7 例、女性 16 例、年齢中央値 61 歳、初回治療例(SOC 不適格例)12 例、PEG-IFN+RBV 無効例 11 例であった。PEG-IFN+RBV 不適格の理由は、高齢であること、喘息、うつ病、脳梗塞、結節性多発動脈炎の既往であった。まず PEG-IFN+RBV 無効例の HCV RNA の経過をみると、4 週目で 10 例中 5 例陰性化した。4 週目で 1.2logIU/ml 未満とならなかったために SOC を併用し、48 週治療を行った症例が 1 例あったが、この症例も終了後後 12 週目まで RNA の陰性化を維持している。最終的な治療効果は SVR91%(10/11)であった。初回治療例は、6 週までに全例 RNA の陰性化を認めた。NS5 領域に治療開始前より耐性変異を有していた症例 3 例中 2 例が治療中に breakthrough を生じ、1 例は治療終了後再燃した。その他 1 例再燃し、最終的な SVR 率は 58%(7/12)であった。全例で HCV core 70 番のアミノ酸変異および *IL28B* genotype 別に治療効果をみると、いずれのタイプにも関わらず 4 週目より 50-60%代の RNA 陰性化を認めており、治療終了後も TT/wild 88%、TT/mutant 50%、TG/wild 50%、TG/mutant でも 100%の SVR を達成した。

D. 考察

Genotype 1b 型、高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN+RBV とローコール®併用療法は、治療中の HCV RNA の陰性化率を上げ、

48 週から 72 週へ治療期間を延長することにより最終的な SVR 率を改善することが可能であった。

また、新規治療薬である Telaprevir (MP-424)と PEG-IFN+RBV 併用療法 24 週間投与の抗ウイルス効果は非常に高く、特に初回治療例や PEG-IFN+RBV 再燃例では高率に SVR を得た。*IL28B* と core70 番のアミノ酸変異が治療効果に関与しており、*IL28B* が TG/GG であると core70 番の変異の有無により SVR 率に有意差を認められた。

Genotype 1b 型、高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する NS5A 阻害剤 (BMS-790052) と PEG-IFN+RBV24 週併用療法は用量比較を行ったが、最終的な SVR 率は 60mg 群が 63%(5/8)、10mg 群が 33%(3/9)であり、60mg 群が高いものと考えられた。また HCV core 70 番が wild か mutant かによっては治療効果に差は認めず、*IL28B* が TG の症例は治療中に HCV RNA が再燃する例があり、SVR 率が低率となるものと考えられた。

NS5A 阻害剤 (BMS-790052)+NS3 阻害剤 (BMS-650032)24 週併用療法は *IL28B* genotype、HCV core70 番の変異の有無によっても、最終的な SVR 率に差は認めず、治療効果は良好であったが、治療開始前の NS3 または NS5A 領域に薬剤耐性変異を持つウイルスを認める症例があり、その治療効果に関しては今後の検討が必要と考えられた。

E. 結論

標準治療にスタチン製剤を併用することは治療効果改善に有用であった。今後は Telaprevir が使用可能となり、短期間の治療で効果は飛躍的に向上することが期待される。しかしながら、高齢者の多い本邦では、より副作用の少ない NS5A 阻害剤などの併用療法が望まれており、さらには内服のみで HCV を制御可能となれば、より多くの症例に治療の機会が与えられ、ひいては肝硬変への進展、発癌を抑制できるものと期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Sezaki H, Suzuki F, Akuta N, et al. An open pilot study exploring the efficacy of fluvastatin, pegylated interferon and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1b in high viral load. *Intervirol.* 2009; 52:43-48.
2. Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, et al.. Rapid loss of hepatitis C virus genotype 1b from serum in patients receiving a triple treatment with telaprevir (MP-424), pegylated interferon and ribavirin for 12 weeks. *Hepatol Res.* 2009;39:1056-63.
3. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, et al. A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response. *J Med Virol.* 2009 ;81:452-8.
4. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to Telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology.* 2010;52:421-9.
5. Kawamura Y, Arase Y, Ikeda K, Hirakawa M, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Yatsuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Kumada H. Diabetes enhances hepatocarcinogenesis in noncirrhotic, interferon-treated hepatitis C patients. *Am J Med.* 2010 ;123:951-956.
6. Kawamura Y, Ikeda K, Hirakawa M, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Kumada H. New classification of dynamic computed tomography images predictive of malignant characteristics of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2010;40:1006-14.
7. Ikeda K, Kobayashi M, Seko Y, Imai N, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Administration of interferon for two or more years decreases early stage hepatocellular carcinoma recurrence rate after radical ablation: A retrospective study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatol Res.* 2010 ;40:1168-75.
8. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. HBcrAg is a predictor of post-treatment recurrence of hepatocellular carcinoma during antiviral therapy. *Liver Int.* 2010;30:1461-70.
9. Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Yatsuji H, Sezaki H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Kumada H. Efficacy of switching to entecavir monotherapy in Japanese lamivudine-pretreated patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25:892-8.
10. Arase Y, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, Kobayashi M, Hosaka T, Yatsuji H, Hirakawa M, Matsumoto N, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Efficacy and safety of combination therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients with genotype 2 and high virus load. *Intern Med.* 2010;49:965-70.
11. Arase Y, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki

- Y, Kawamura Y, Kobayashi M, Hosaka T, Yatsuji H, Hirakawa M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Efficacy and safety of combination therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients with genotype 1b and high virus load. *Intern Med.* 2010;49:957-63.
12. Akuta N, Suzuki F, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Extending combination therapy with peginterferon plus ribavirin for genotype 2 chronic hepatitis C virological responders: a pilot study of 7 cases. *Intervirology.* 2010;53:188-92.
 13. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin. *J Med Virol.* 2010;82:575-82.
 14. Hashimoto Y, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saito 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.* 2010;82:684-91.
 15. Suzuki Y, Ikeda K, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Kobayashi M, Miyakawa Y, Kumada H. Association of HLA-DR14 with the treatment response in Japanese patients with autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2010;55:2070-6.
 16. Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Hosaka T, Kawamura Y, Yatsuji H, Hirakawa M, Ikeda K, Hsieh SD, Oomoto Y, Amakawa K, Kato H, Kazawa T, Tsuji H, Kobayashi T, Kumada H. Virus clearance reduces bone fracture in postmenopausal women with osteoporosis and chronic liver disease caused by hepatitis C virus. *J Med Virol.* 2010;82:390-5.
 17. Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Hosaka T, Sezaki H, Kobayashi M, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Watahiki S, Mineta R, Iwasaki S, Miyakawa Y, Kumada H. Influence of amino-acid polymorphism in the core protein on progression of liver disease in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol.* 2010 ;82:41-8.
 18. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Yatsuji H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Iwasaki S, Kumada H. Sustained virological response in a patient with chronic hepatitis C treated by monotherapy with the NS3-4A protease inhibitor telaprevir. *J Clin Virol.* 2010;47:76-8.
 19. Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Sezaki H, Kobayashi M, Kawamura Y, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Iwasaki S, Watahiki S, Kumada H. Correlation of YMDD mutation and breakthrough hepatitis with hepatitis B virus DNA and serum ALT during lamivudine treatment. *Hepatol Res.* 2010;40:125-34.
 20. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Hirakawa M, Kawamura Y, Yastuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H. Development of HCC in patients receiving adefovir dipivoxil for lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants. *Hepatol Res.* 2010;40:145-52.

21. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Chayama K, Kamatani N, Nakamura Y, Miyakawa Y, Kumada H. Influence of *ITPA* Polymorphism on Decreases of Hemoglobin during Treatment with Pegylated IFN, Ribavirin and Telaprevir. *Hepatology*. 2011;53:415-21.
22. 八辻寛美、鈴木文孝、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、斉藤 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 変異ウイルスが増殖した 1 症例. *肝臓* 2010; 51: 196-198.
23. 小林 万利子、鈴木文孝、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、綿引祥予、中村祐輔、茶山一彰、熊田博光. *IL28B* と HCV Core aa70 置換との関係. *肝臓* 2010; 51: 322-323.
24. 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、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、斉藤 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バ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果の検討. *肝臓* 2010; 51: 394-396.
25. Arase Y, Suzuki F, Kawamura Y, Suzuki Y, Kobayashi M, Matsumoto N, Akuta N, Sezaki H, Hosaka T, Ogawa K, Imai N, Seko Y, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Development rate of chronic kidney disease in hepatitis C virus patients with advanced fibrosis after interferon therapy. *Hepatol Res*. 41:946-954,2011.
26. Imai N, Ikeda K, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Previous chemoembolization response after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) can predict the anti-tumor effect of subsequent TACE with miriplatin in patients with recurrent hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 80:188-194,2011.
27. Chayama K, Hayes CN, Abe H, Miki D, Ochi H, Karino Y, Toyota J, Nakamura Y, Kamatani N, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H. *IL28B* But Not *ITPA* Polymorphism Is Predictive of Response to Pegylated Interferon, Ribavirin, and Telaprevir Triple Therapy in Patients With Genotype 1 Hepatitis C. *J Infect Dis*. 204:84-93,2011.
28. Arase Y, Suzuki F, Kobayashi M, Suzuki Y, Kawamura Y, Matsumoto N, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Ohmoto Y, Amakawa K, Tsuji H, Hsieh SD, Kato K, Tanabe M, Ogawa K, Hara S, Kobayashi T. The Development of Chronic Kidney Disease in Japanese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Intern Med*. 50:1081-1087,2011.
29. Azakami T, Hayes CN, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Common genetic polymorphism of *ITPA* gene affects ribavirin-induced anemia and effect of peg-interferon plus ribavirin therapy. *J Med Virol*. 83:1048-1057,2011.
30. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura

- Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in hepatitis C virus core region predict hepatocarcinogenesis following eradication of HCV RNA by antiviral therapy. *J Med Virol.* 83:1016-1022,2011.
31. Ikeda K, Kobayashi M, Kawamura Y, Imai N, Seko Y, Hirakawa M, Hosaka T, Sezaki H, Akuta N, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Stage progression of small hepatocellular carcinoma after radical therapy: comparisons of radiofrequency ablation and surgery using the Markov model. *Liver Int.* 31:692-699,2011.
32. Arase Y, Suzuki F, Kobayashi M, Suzuki Y, Kawamura Y, Matsumoto N, Akuta N, Imai N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Ohmoto Y, Amakawa K, Tsuji H, Hsieh SD, Kobayashi T. Efficacy and safety in sitagliptin therapy for diabetes complicated by chronic liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatol Res.* 41:524-529,2011.
33. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Chayama K, Kamatani N, Nakamura Y, Miyakawa Y, Kumada H. Influence of *ITPA* Polymorphism on Decreases of Hemoglobin during Treatment with Pegylated IFN, Ribavirin and Telaprevir. *Hepatology.* 53:415-421,2011.
34. 鈴木義之、瀬崎ひとみ、芥田憲夫、鈴木文孝、今井則博、平川美晴、川村祐介、保坂哲也、小林正宏、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、小林万利子、熊田博光。NS5A 阻害剤と NS3 プロテアーゼ阻害剤併用投与における早期抗ウイルス効果。肝臓 2011 ; 67 : 147-149.
35. 保坂哲也、鈴木文孝、小林正宏、瀬古裕也、今井則博、平川美晴、川村祐介、瀬崎ひとみ、芥田憲夫、鈴木義之、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、小林万利子、熊田博光。B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ療法による HBs 抗原消失とその関連因子の検討。肝臓 2011 ; 52(4) : 255-257.
36. 小林万利子、鈴木文孝、鈴木義之、芥田憲夫、瀬崎ひとみ、川村祐介、瀬古裕也、保坂哲也、小林正宏、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光。コバス TaqManHBV「オート」v2.0 における同一時の血清検体と血漿検体の HBVDNA 検出率の検討。肝臓 2011 ; 52(11) : 756-757.
- 2.学会発表
1. 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、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バビリン併用療法の治療成績と高齢女性の治療効果規定因子の検討、第 95 回日本消化器病学会総会、札幌、2009.5.7.
2. 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、平川美晴、川村祐介、八辻寛美、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、熊田博光. Genotype 2 型 C 型慢性肝炎症例に対するリバビリン併用療法における治療効果と年齢との関係についての検討、第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、2009.6.4.
3. 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光. C 型慢性肝炎に対する NS3-4A protease inhibitor とペグインターフェロン-リバビリン 3 者併用療法の治療成績、JDDW、京都、2009.10.15.
4. 芥田憲夫、鈴木文孝、熊田博光、平川美晴、川村祐介、八辻寛美、瀬崎ひとみ、鈴木義之、保坂哲也、小林正宏、小林万利子、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次. HCV core アミノ酸置換の新規抗 HCV 療法・肝発癌に及ぼす影響、第 96 回日本消化器病学会総会、