

Research Article

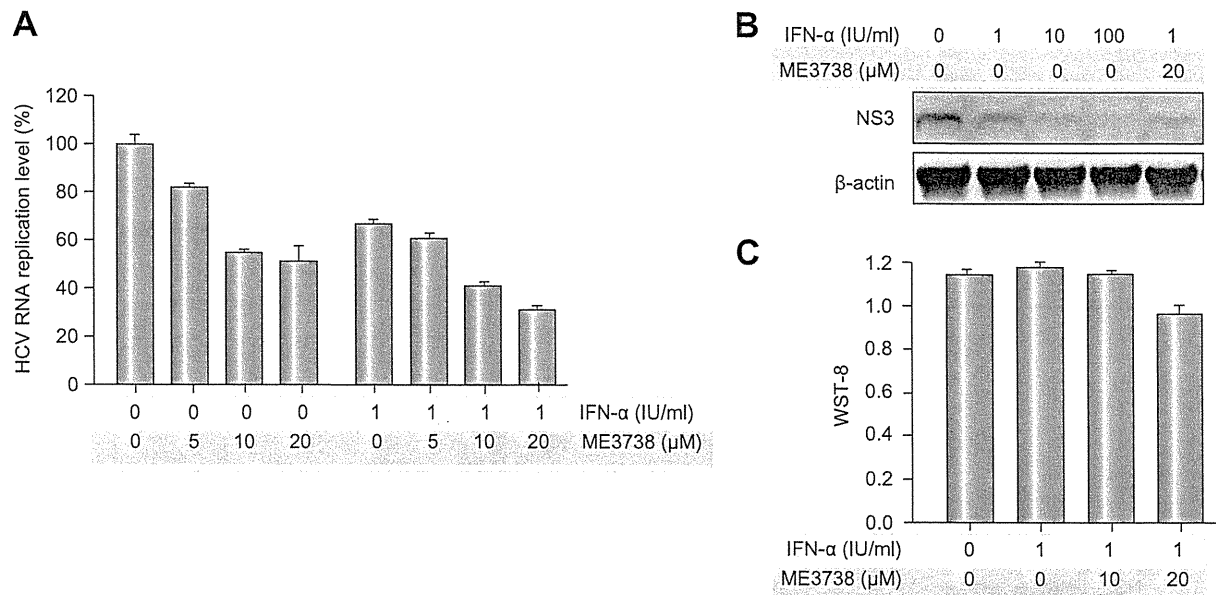


Fig. 2. Effects of ME3738 on HCV replication in the subgenomic HCV replicon, Con1 cells. Con1 cells were treated for 72 h with the indicated concentration of ME3738 alone or IFN- α plus ME3738. (A) Intracellular HCV RNA replication levels were determined via real-time PCR. (B) Cell lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies to NS3 and β -actin. (C) Cellular viability was analyzed by WST assay. Data are represented as the mean \pm SD of 6 experiments. Control: cells treated with neither ME3738 nor IFN- α .

the reduction of HCV in chimeric mice was not due to toxicity of the drugs (Fig. 4A). This was also supported by histopathological findings, including lack of cytotoxic changes in the livers of all four groups of mice (Fig. 4C). The effect of ME3738 to increase ISG expression was assessed in mouse liver following treatment with a high concentration of ME3738 for 1 week and a single injection of IFN- α . ME3738 alone showed no increase in the expression of ISGs in mouse livers (Fig. 5). IFN- α treatment significantly increased the expression of ISGs; however, IFN- α /ME3738 combination treatment significantly induced the expressions of *OAS1*, *PKR* and *USP18* mRNA levels in mouse livers to levels higher than IFN- α alone. These results indicate that ME3738 inhibits HCV replication, enhancing the effect of IFN- α to increase ISG expression *in vivo*.

Discussion

Although the treatment outcome of chronic HCV infection has improved with the advent of pegylated IFN- α and ribavirin, the eradication rate of HCV is only about 50%. Many patients are unable to receive this therapy because of the harmful side effects or the financial costs. Development of effective, safe and inexpensive therapies should be encouraged.

ME3738 is reported to attenuate various liver pathologies in animals [8–12]. Furthermore, Hiasa et al. reported recently that ME3738 induces IFN- β mRNA expression and inhibits the replication of HCV [13]. We thus attempted in this study to evaluate the effect of ME3738, especially in combination with IFN- α , on HCV.

The results of the present study show that ME3738 induced the gene expression of *OAS* (Fig. 2) and inhibited HCV replication (Fig. 1A). Hiasa et al. reported that ME3738 enhanced the expression of IFN- β mRNA and that the enhanced production of IFN- β

resulted in the increased expression of ISGs [13]. They showed also that the effect of ME3738 on HCV was abolished following the inhibition of IFN- β expression with siRNA or antibody. Our results are consistent with their findings. The extent of the increase in ISG expression was smaller in Hiasa et al. [13] than in our results. This is probably because they used the T7-genotype 1a-cDNA transient transfection-infection system to produce HCV in HepG2 or Huh7 cells [13,24,25] and assessed the effect of ME3738 by utilizing naturally produced IFN- β . The amount of IFN is likely to be very small in their system compared to that used in our study. We also tried to detect IFN- β mRNA in our replicon system but were unable to detect it in our replicon cells (Huh7 based ORN/3-5B/KE cells and Con1 cells). This is probably due to a defect of the innate immune system in producing IFN- β in those cells. This is consistent with their finding that ME3738 had an inferior effect in Huh7 cells than in HepG2 cells to produce ISG products [13].

As we showed in this study, ME3738 enhances the effect of IFN against HCV replication both *in vitro* (Figs. 1B and 2A) and *in vivo* (Figs. 4A and 4B). ME3738 enhanced the effect of IFN- α by increasing the expression levels of ISGs both *in vitro* (Fig. 3) and *in vivo* (Fig. 5). How ME3738 enhances the transcription of ISGs is unknown at this stage. ME3738 was reported initially to protect liver cells against injury through induction of IL-6 [8,9]. IL-6 is reported to provide protection to certain cells [26–28] by preventing apoptosis. In the present study, we tried to detect IL-6 protein in the serum and mRNA in the liver of ME3738-treated mice. However, the levels of both were too low to measure. Further studies should be conducted to elucidate the mechanism by which ME3738 enhances immunity against viral infections.

Our results showed that ME3738 did not reduce cell viability. We also showed that the drug is not hepatotoxic, as inferred by HSA level and liver histology. Since ME3738 is reported to

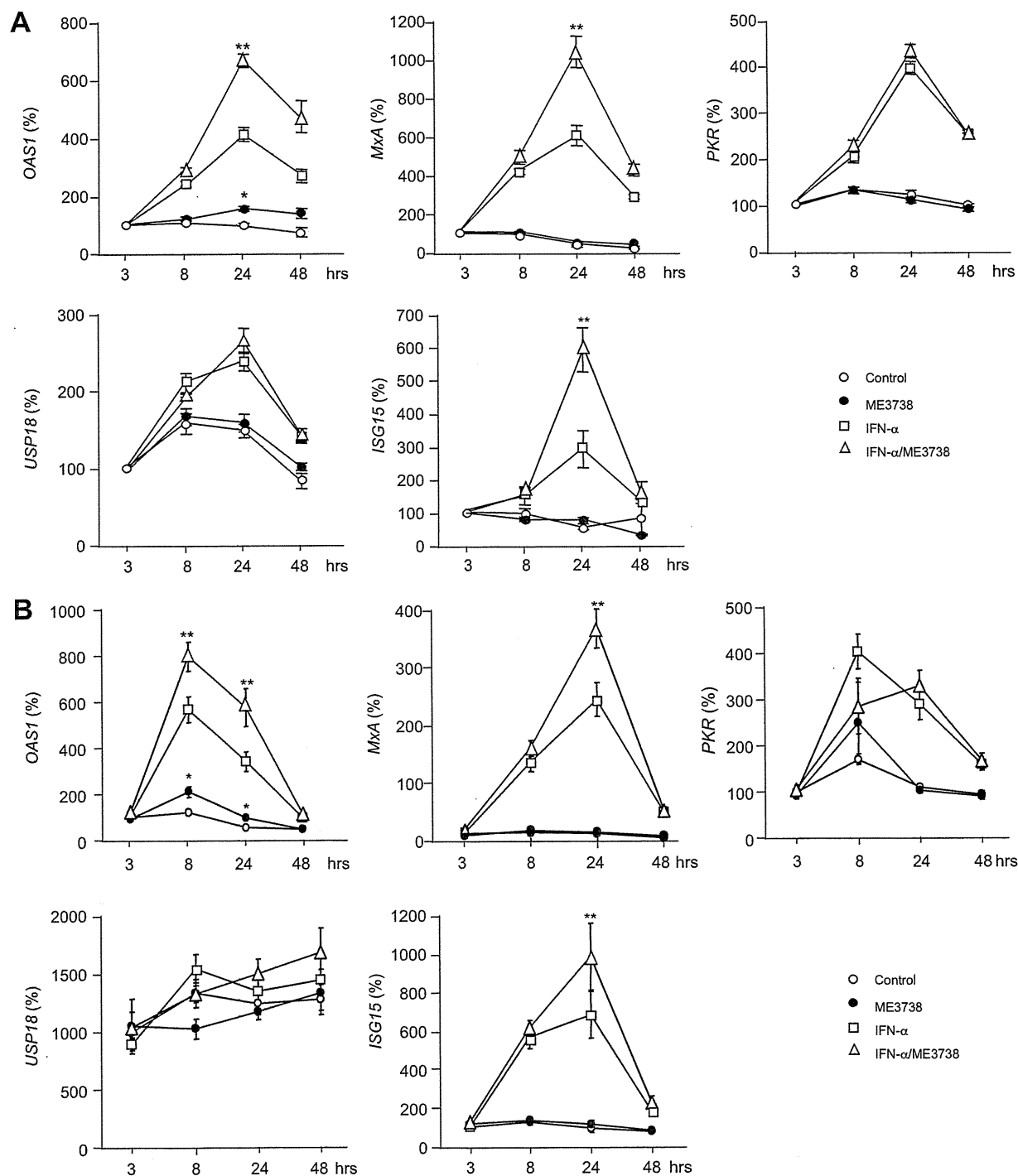


Fig. 3. Effects of ME3738 on the expression of interferon-stimulated genes. ORN/C-5B/KE cells (A) and Con1 cells (B) were treated with 20 μ M of ME3738 and/or 1 IU/ml of interferon (IFN)- α for 48 h. Intracellular gene expression levels of oligoadenylate synthetase (OAS), myxovirus resistance protein A (MxA), double stranded RNA-activated protein kinase (PKR), USP-18 and interferon-stimulated gene (ISG) 15 were measured at the indicated times. RNA levels were expressed relative to GAPDH mRNA. Data are shown as the mean \pm SD of 6 experiments. Control: cells treated with neither ME3738 nor IFN- α . (* p < 0.05 compared with Control, ** p < 0.05 compared with IFN- α treatment).

Research Article

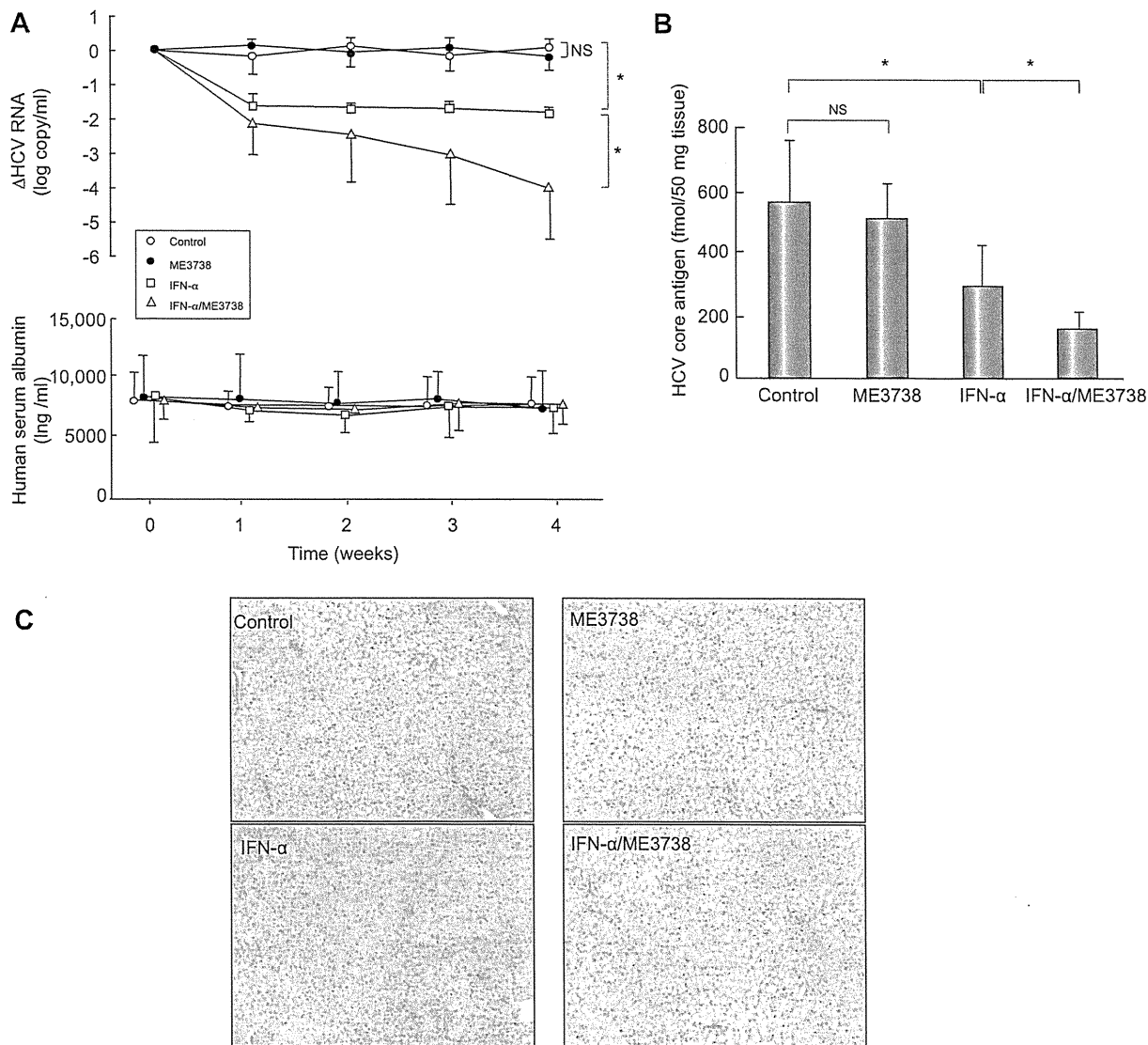


Fig. 4. ME3738 enhances the effect of IFN in mice with HCV infection. Mice were injected intravenously with 50 μ l of HCV-positive human serum samples. Six weeks after HCV infection, mice were treated with ME3738 and/or interferon (IFN)- α for 4 weeks. (A) Mouse serum samples were obtained every week, and HCV RNA titer (upper panel) and human serum albumin concentration (lower panel) were analyzed. (B) HCV core antigen was measured in the mouse livers after 4 weeks of treatment. Data are mean \pm SD of 6 mice. (* p < 0.05; ** p < 0.01; NS, not significant). (C) Liver samples obtained from mice were stained with hematoxylin-eosin (Original magnification, 100 \times). Note the lack of specific changes in the mice of each group. Control: HCV-infected mice treated with neither ME3738 nor IFN- α .

Table 1. Concentrations of ME3738 in mouse serum samples.

	Control	ME3738	IFN- α	ME3738/ IFN- α
ME3738 (μ M)	<0.01	4.02 \pm 0.90	<0.01	2.44 \pm 0.21

Concentrations of ME3738 in serum samples obtained from mice after 4 weeks of treatment were measured by liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry. Data are shown as mean \pm SD of three mice. Control: HCV-infected mice treated with neither ME3738 nor IFN- α .

attenuate liver disease in several animal models of acute and chronic liver injury [8–12], the drug could be suitable for

treatment of patients with chronic hepatitis C. In the current regimen of PEG-IFN and ribavirin combination therapy, IFN reduces the replication rate of the virus by inducing expression of ISGs in liver cells. Ribavirin enhances the effect of IFN synergistically through an unknown mechanism. ME3738 also enhances the effect of IFN similarly to ribavirin and may protect liver cells from apoptosis. Combination therapy using these three drugs might yield excellent anti-viral and anti-inflammatory effects. Alternatively, ME3738 could be used instead of ribavirin if the drug shows a superior effect in combination with IFN. Further animal and human studies should be conducted to develop an effective regimen for the treatment of patients with chronic hepatitis C.

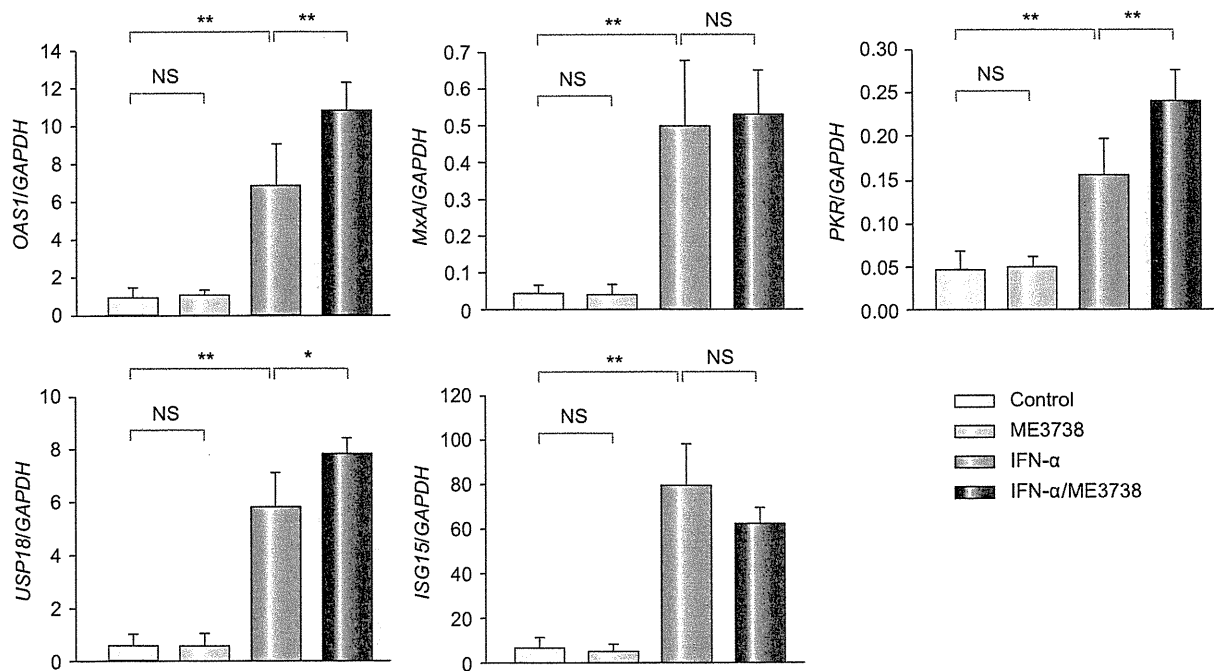


Fig. 5. Interferon-stimulated gene expression in mouse liver samples. Mice were treated with or without 0.45% (w/w) ME3738 for 1 week and then given a single injection of 1500 IU/g IFN- α . Four hours after IFN- α injection, interferon stimulated gene expression in mouse livers was measured. RNA levels are expressed relative to GAPDH mRNA. Data are presented as mean \pm SD of six mice. Control: Mice treated with neither ME3738 nor IFN- α . (* p < 0.05; ** p < 0.01; NS, not significant).

Conflict of interest

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

Financial support

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Labor and Health and Welfare.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Rie Akiyama and Kazuyo Hattori for the excellent technical assistance, and Masanori Ikeda and Nobuyuki Kato for providing ORN/3-5B/KE cells.

References

- [1] WHO: Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 1999;6:35–47.
- [2] Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990;12:671–675.
- [3] Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hürter D, et al. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* 1998;28:1687–1695.
- [4] Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958–965.
- [5] Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales Jr FL, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975–982.
- [6] 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.
- [7] Sasaki K, Minowa N, Kuzuhara H, Nishiyama S. Preventive effects of soyasapogenol B derivatives on liver injury in a concanavalin A-induced hepatitis model. *Bioorg Med Chem* 2005;13:4900–4911.
- [8] Klein C, Wüstefeld T, Heinrich PC, Streetz KL, Manns MP, Trautwein C. ME3738 protects from concanavalin A-induced liver failure via an IL-6-dependent mechanism. *Eur J Immunol* 2003;33:2251–2261.
- [9] Kuzuhara H, Nakano Y, Yamashita N, Imai M, Kawamura Y, Kurosawa T, et al. Protective effects of alpha1-acid glycoprotein and serum amyloid A on concanavalin A-induced liver failure via interleukin-6 induction by ME3738. *Eur J Pharmacol* 2006;541:205–210.
- [10] Fukumura A, Tsutsumi M, Tsuchishima M, Hayashi N, Fukura M, Yano H, et al. Effect of the inducer of interleukin-6 (ME3738) on rat liver treated with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31:S49–S53.
- [11] Nomoto M, Miyata M, Shimada M, Yoshinari K, Gonzalez FJ, Shibasaki S, et al. ME3738 protects against lithocholic acid-induced hepatotoxicity, which is associated with enhancement of biliary bile acid and cholesterol output. *Eur J Pharmacol* 2007;574:192–200.
- [12] Maeda K, Koda M, Matono T, Sugihara T, Yamamoto S, Ueki M, et al. Preventive effects of ME3738 on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *Hepatol Res* 2008;38:727–735.
- [13] Hiasa Y, Kuzuhara H, Tokumoto Y, Konishi I, Yamashita N, Matsuura B, et al. Hepatitis C virus replication is inhibited by 22beta-methoxyolean-12-ene-3beta, 24(4beta)-diol (ME3738) through enhancing interferon-beta. *Hepatology* 2008;48:59–69.
- [14] Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Yasuji A, Koida I, Saitoh S, et al. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994;19:1088–1094.
- [15] Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001;7:927–933.

Research Article

- [16] Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004;165:901–912.
- [17] Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett* 2007;581:1983–1987.
- [18] Kneteman NM, Weiner AJ, O'Connell J, Collett M, Gao T, Aukerman L, et al. Anti-HCV therapies in chimeric acid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* 2006;43:1346–1353.
- [19] Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, et al. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 2008;89:2108–2113.
- [20] Ikeda M, Abe K, Dansako H, Nakamura T, Naka K, Kato N. Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:1350–1359.
- [21] Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005;309:623–626.
- [22] Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, et al. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *J Gen Virol* 2007;88:432–440.
- [23] Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, et al. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1999;37:1802–1808.
- [24] Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002;36:211–218.
- [25] Lanford RE, Guerra B, Lee H, Averett DR, Pfeiffer B, Chavez D, et al. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(I)-poly(C), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol* 2003;77:1092–1104.
- [26] Kolliputi N, Waxman AB. IL-6 cytoprotection in hyperoxic acute lung injury occurs via suppressor of cytokine signaling-1 induced apoptosis signal-regulating kinase-1 degradation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:314–324.
- [27] Xu G, Zhang Y, Zhang L, Ren G, Shi Y. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;361:745–750.
- [28] Rollwagen FM, Madhavan S, Singh A, Li YY, Wolcott K, Maheshwari R. IL-6 protects enterocytes from hypoxia-induced apoptosis by induction of bcl-2 mRNA and reduction of fas mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347:1094–1098.

慢性肝疾患における肝線維化の非侵襲的評価
—FibroScan の使用経験から—

松本 照雄 早田 哲郎 西澤 新也
森原 大輔 田中 崇 上田 秀一
阿南 章 竹山 康章 入江 真
岩田 郁 釈迦堂 敏 向坂彰太郎

福岡大学医学部消化器内科

Teruo MATSUMOTO, Tetsuro SOHDA, Shinya NISIZAWA,
Daisuke MORIHARA, Takashi TANAKA, Shuichi UEDA,
Akira ANAN, Yasuaki TAKEYAMA, Makoto IRIE,
Kaoru IWATA, Satoshi SHAKADO and Shotaro SAKISAKA

Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学医学紀要
第38巻第1号別冊
平成23年3月

Non-Invasive Evaluation of Liver Fibrosis in Patients with Chronic Liver Diseases

Teruo MATSUMOTO, Tetsuro SOHDA, Shinya NISIZAWA,
Daisuke MORIHARA, Takashi TANAKA, Shuichi UEDA,
Akira ANAN, Yasuaki TAKEYAMA, Makoto IRIE,
Kaoru IWATA, Satoshi SHAKADO and Shotaro SAKISAKA

Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Abstract : We recently evaluated the use of transient elastography (FibroScan) to measure liver stiffness. In this study, 93 patients with chronic liver diseases were examined by transient elastography, and we compared their liver stiffness to the results obtained using several other evaluation methods for liver fibrosis based on a simple blood test. Liver stiffness was significantly correlated with FIB-4, which is calculated by $\text{age} \times \text{AST} [\text{IU/l}] / (\text{platelet count} [10^9/\text{l}] \times \text{ALT} [\text{IU/l}]^{0.5})$. Thus, we speculated that FIB-4 is a useful non-invasive method for diagnosing liver fibrosis. However, in three cases, there was no association between the results of FIB-4 and liver stiffness which appeared to be due to thrombocytopenia. In these patients, the performance of transient elastography is therefore necessary to evaluate the extent of liver fibrosis.

Key words : Transient elastography (FibroScan), Liver stiffness, FIB-4, Chronic liver diseases

慢性肝疾患における肝線維化の非侵襲的評価 —FibroScan の使用経験から—

松本 照雄	早田 哲郎	西澤 新也
森原 大輔	田中 崇	上田 秀一
阿南 章	竹山 康章	入江 真
岩田 郁	釈迦堂 敏	向坂彰太郎

福岡大学医学部消化器内科

要旨 : 超音波を利用して肝弾性度を測定する FibroScan を使用する機会を得たため、さまざまな肝疾患患者の肝弾性度を測定し、血液学的パラメーターとの比較を行った。年齢 \times AST [IU/l]/(血小板数 $[10^9/\text{l}] \times$ ALT [IU/l]^{0.5}) で表す FIB-4 値が肝弾性度とよく相関し、一般外来診療において有用と考えられたが、極端な血小板低下がある症例では過大評価する可能性があり、注意を要すると考えられた。

キーワード : FibroScan, 肝弾性度, FIB-4, 慢性肝疾患

はじめに

慢性肝疾患の診療において、肝線維化の評価は非常に重要である。しかし、従来から行われてきた肝生検は、腹腔内出血などのリスクを伴うこともあり¹⁾、外来では簡単に施行できない。そこで、血液検査だけで肝線維化を概算しようとの工夫がなされてきた。特に、通常の外来診療で繁用される簡易な血液検査だけで肝線維化予測ができれば非常に利用価値は高く、最近では血小板数や血清トランスアミナーゼだけ、あるいは、これに年齢を加えた簡易な肝線維化診断の有用性が報告されている²⁾⁻⁵⁾。

一方、超音波を利用して肝弾性度を測定する FibroScan (Echosens, Paris) が開発された⁶⁾。これは非侵襲的であり、安全かつ簡単に施行できる。診断能については多くの報告があり、特に肝硬変の診断については非常に優れていると報告されている⁷⁾。我々は、今回この FibroScan を使用する機会を得たため、さまざまな肝疾患患者の肝弾性度を測定し、血液学的パラメーターとの比較を行った。

方法

対象

当科に入院あるいは外来を受診した慢性肝疾患患者で、FibroScan による肝弾性度測定の同意が得られた93例について解析を行った。平均年齢は61.3歳で、男性47例、女性46例。肝障害の原因別の内訳は、C型肝炎ウイルス (HCV) 56例、B型肝炎ウイルス (HBV) 11例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 8例、自己免疫性肝炎 (AIH) 2例、脂肪肝6例、アルコール性肝障害3例、その他7例であった。肝癌を伴っているものは除外した。

血液検査をベースとした線維化パラメーター

肝線維化と関連するとの報告がある血小板数²⁾、ASTとALTの比 (AST/ALT)³⁾、ASTと血小板の比 (aspartate aminotransferase platelet ratio index = APRI)⁴⁾、FIB-4⁵⁾ を選択した。APRI は (AST/正常上限)/血小板数 $[10^9/l] \times 100$ で算出し、FIB-4 値は、Vallet-Pichard らの報告に従い、年齢 \times AST $[IU/l]$ / (血小板数 $[10^9/l] \times$ ALT $[IU/l]$ ^{0.5}) で求めた。

FibroScan による肝弾性度測定

測定は肝右葉にて行った。患者を左側臥位にし、右肋間にプローブを当て連続して測定し、10回の有効値が得られた時点で終了した。肝弾性度は kPa で表し、10回の中央値を用いた。

血液検査をベースとした線維化パラメーターと肝弾性度の相関

血液線維化パラメーターと肝弾性度の相関は回帰分析によって解析した。統計ソフトは JMP version 5.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。

肝弾性度と FIB-4 値の乖離例の検討

回帰直線から、肝弾性度 (kPa) に相当する FIB-4 予測値を算出した。実測値との比 (予測 FIB-4 / 実測 FIB-4) が平均 \pm 2 SD から逸脱する症例を乖離例として抽出し、その臨床的特徴について検討した。

結 果

肝弾性度

全93例における肝弾性度は2.5から67.8kPaで、中央値は8.8kPaであった。測定が困難な症例や値がばらつく症例はなかった。肝硬変診断のカットオフ値⁷⁾として報告がある12.5kPaを超える症例は、31例で、この内訳は、HCV陽性例が23例 (/56例=41%)、HBV陽性例が2例 (/11例=18%)、PBCが2例 (/8例=25%)、脂肪肝1例 (/6例=17%)、アルコール性肝障害1例 (/3例=33%)、その他2例 (/7例=29%)であった。

血液検査をベースとした線維化パラメーターと肝弾性度の相関

血小板数は肝弾性度が高値になるに従って低下する傾向を認めた (図1)。しかし、肝弾性度が12.5kPa以下の症例について検討すると、その逆相関性は非常に弱くなった。

AST/ALT比は肝弾性度が低いものから高いものまでほとんど変化がなく、AST/ALT比と肝弾性度との相関は非常に弱いことが示された (図2)。

APRIと肝弾性度との間には良好な相関を認めた。また、肝弾性度12.5kPaで2群に分けた場合も、両群とも比較的相関していた (図3)。

FIB-4と肝弾性度は最も強い相関を示した (図4)。肝弾性度12.5kPaで2群に分けた場合、特に12.5kPa以上の症例において、良好な相関を認めた。また、肝障害の原因別にみても、HCV陽性例、HBV陽性例ともに両者はよく相関した (図5)。今回検討した血液検査をベースとした線維化パラメーターの中では、FIB-4が肝弾性度と最も強い相関を示し、このFIB-4と肝弾性度の回帰直線は、 $[FIB-4 = 1.2797325 + 0.2140678 \text{ 肝弾性度 (kPa)}]$ で表された。

肝弾性度と FIB-4 値の乖離例の検討

上記の計算式から求めた FIB-4 予測値と実際の FIB

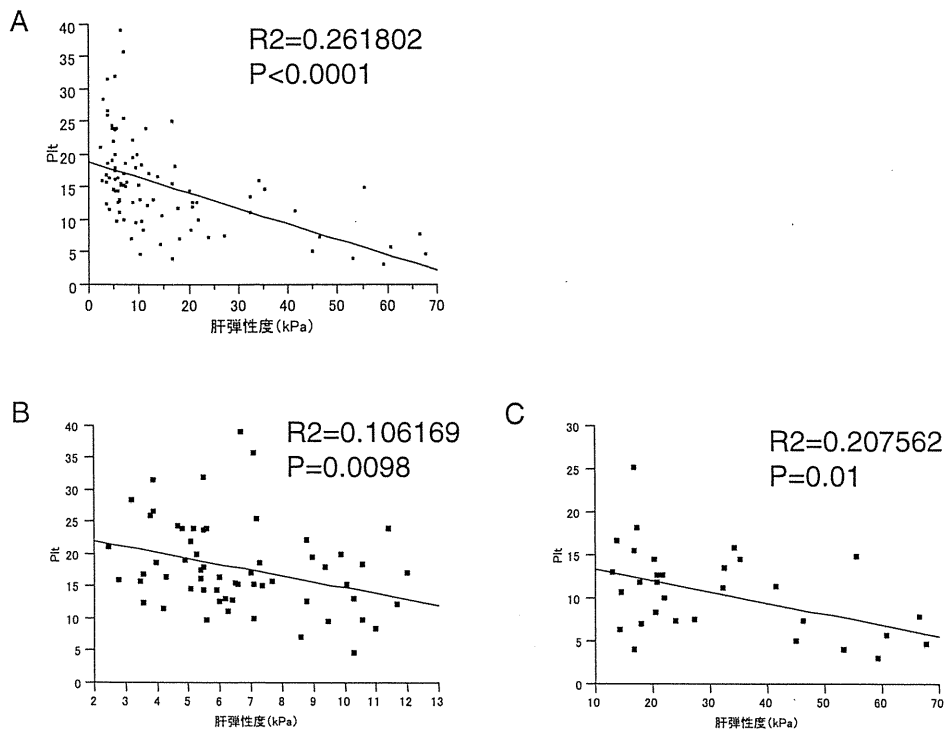


図1 血小板数 (Plt) と肝弾性度とは逆相関を認めた (A), 肝弾性度が 12.5kPa 以下の症例 (B) と以上の症例 (C) に分けると, 特に 12.5kPa 以下の症例では逆相関性が弱くなった.

-4 との乖離例は 3 例あり, その患者背景を表 1 に示す. これらは全て肝弾性度に比較し FIB-4 値が非常に高値を示していた. 平均年齢は 64.3 歳 (53-76 歳) で, 全例が女性であった. 3 例中 2 例は HCV 陽性者で, 他の 1 例は原因不明の肝障害であった. HCV 陽性の 2 例は血小板低下が著明であった. 他の 1 例は高齢女性で, AST 優位の強い肝障害があり, BMI が低かった.

考 察

肝線維化の評価は従来から病理学的な方法によって行われてきたが, 最近では非侵襲的な方法が数多く検討され, その代表的である FibroScan が今や gold standard になりつつある. FibroScan は線維化の程度を直接観察するものではないが, 肝生検におけるサンプリングエラーの問題や, 病理診断の難しさがなく, 線維化診断の正確さにおいてコンセンサスが得られている. しかし, 我々は短期間ではあるが使用機会を得たものの, 国内においてまだ広く普及しているとは言い難い.

一方, 簡単な血液検査などを基に外来診療で簡単に肝線維化を概算できる方法が報告されているため, 今回, これらと FibroScan による肝弾性度を比較した. 今回検討した血小板数, AST/ALT, APRI, FIB-4 のうち, AST/ALT 比以外は肝弾性度と相関あるいは逆相関を認めた. その中でも, FIB-4 は肝弾性度と最もよ

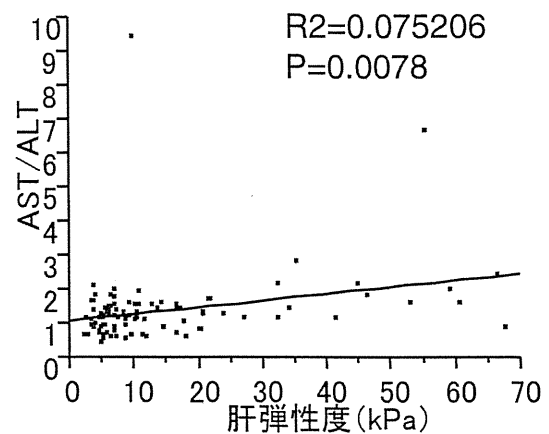


図2 AST/ALT 比と肝弾性度との相関は非常に弱かった.

く相関しており, 肝線維化のよい指標となることが確認された.

血液検査をベースとした肝線維化の評価は, 経過中のデータの変動が少なく, 少しずつ線維化が進行するものに適しており, これに最も合致するのは HCV 関連肝疾患である. Vallet-Pichard らの報告⁵⁾ は HCV 関連肝疾患を対象にしており, 本研究においても HCV 群における FIB-4 値は肝弾性度と非常に強い相関を示した.

しかし, 3 例の乖離例のうち 2 例は HCV 群であった. この 2 症例は, 他の肝機能検査に比較して, 特に血小板数が低いのが特徴であるが, FIB-4 など血液検査

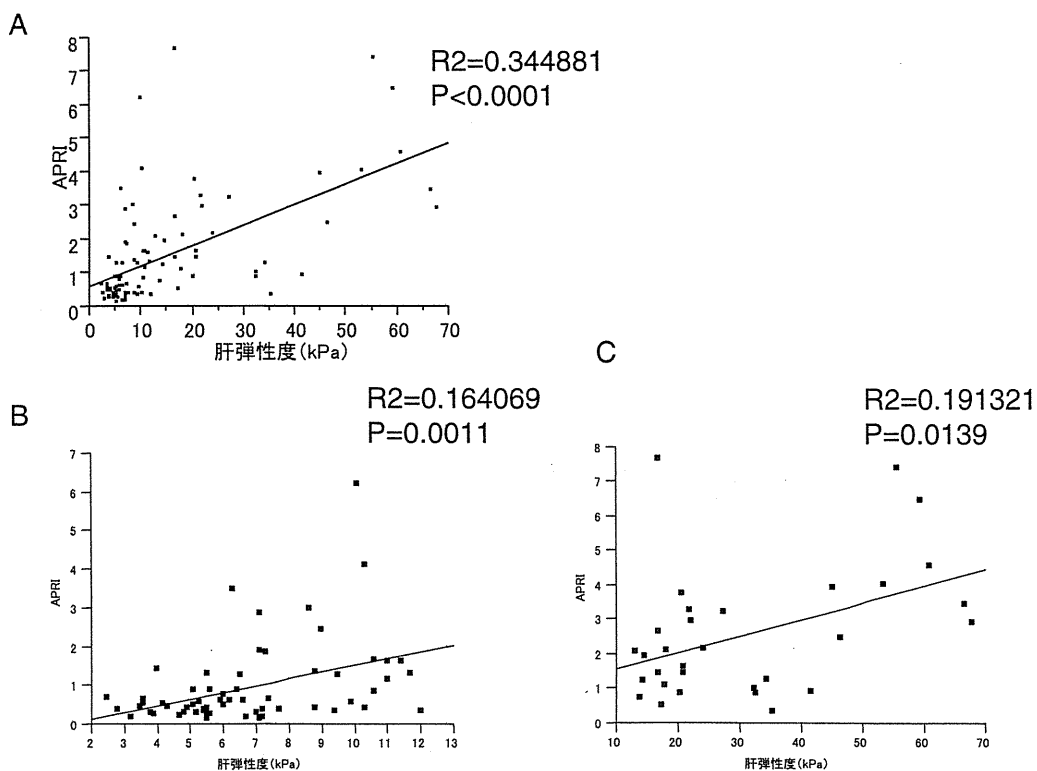


図3 APRI と肝弾性度は良好な相関を認めた (A). 肝弾性度が 12.5kPa 以下の症例 (B) と以上の症例 (C) に分けた場合、両群とも比較的に相関していた。

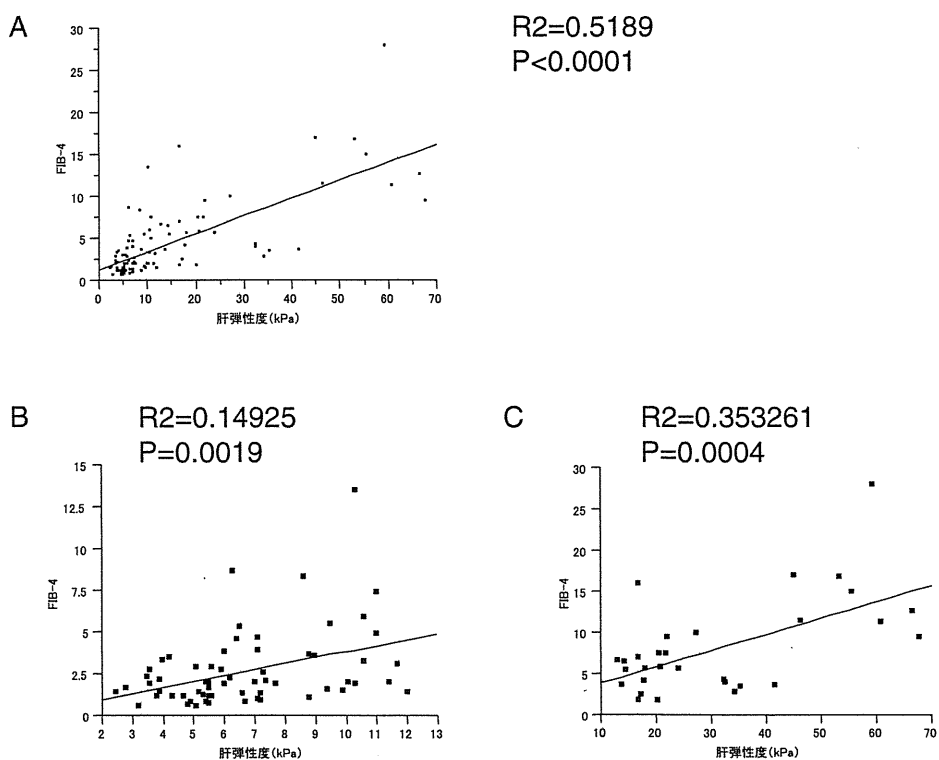


図4 FIB-4 と肝弾性度は最も強い相関を示した (A). 肝弾性度が 12.5kPa 以下の症例 (B) と以上の症例 (C) に分けた場合、特に 12.5kPa 以上の症例において、良好な相関を認めた。

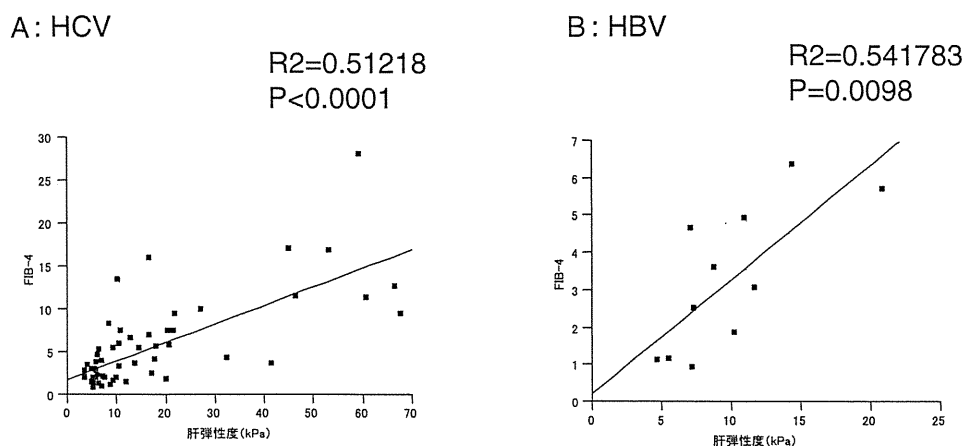


図5 HCV 陽性例 (A), HBV 陽性例 (B) とともに FIB-4 と肝弾性度はよく相関した。

表 1 乖離例の背景

	症例 1	症例 2	症例 3
年齢 (歳)	64	53	76
性別	F	F	F
肝障害の原因	HCV	HCV	cryptogenic
FIB-4	134.72	158.82	86.35
肝弾性度 (kPa)	10.3	16.8	6.3
BMI (%)	21.7	18.1	16.4
脾腫	有	有	無
WBC (/ μ l)	2,000	2,900	1,400
Hb (g/dl)	11.7	11.5	11.7
Plt (104/ μ l)	4.6	4.0	11.1
アルブミン (g/dl)	3.8	2.6	3.3
ビリルビン (mg/dl)	0.6	2.1	0.5
AST (IU/l)	62	101	128
ALT (IU/l)	41	71	103

をベースとした肝線維化の評価法の多くは計算式の中に血小板数を含むため、線維化以外の原因で血小板数が低下している症例には注意が必要である。突出して血小板低下が著明な例は、脾腫が著明な場合、あるいは、他の血小板低下症を偶然に合併した場合などが考えられる。また、PBC や AIH といった自己免疫性肝疾患に限らず、C型慢性肝炎においても様々な自己免疫現象を伴うことが知られているが、その中の一つに特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) がある⁸⁾。肝機能に比較して極端に血小板数が低い場合は、このような自己免疫的な機序によるものも考えるべきである。

一方、脾摘後に血小板が上昇した症例についても FIB-4 などによる線維化の評価は正確に行えない。FIB-4 は血小板低値症例では、肝線維化を過大に算出し、脾摘後の症例では逆に過小に算出する。このような症例は FibroScan を用いて正確に線維化の程度を評価する方法は有用であると考えられる。

結 語

FibroScan による肝弾性度の測定値は、血小板数、APRI、FIB-4 とよく相関するが、肝機能に比較して極端に血小板数が低いような症例においては、血液検査をベースとしたパラメーターは正しい肝線維化の評価には問題がある。このような場合は、FibroScan を用いて正確に線維化の程度を評価する必要があると思われた。

文 献

- 1) Bravo AA, Sheth SG, Chopra S: Liver biopsy. *N Engl J Med* 344: 495-500, 2001.
- 2) Poynard T, Bedossa P: Age and platelet count: a simple index for predicting the presence of histological lesions in patients with antibodies to hepatitis C virus. METAVIR and CLINIVIR Cooperative Study Groups. *J Viral Hepat* 4: 199-208, 1997.
- 3) Giannini E, Rizzo D, Testa R: Transportability and

- reproducibility of the AST/ALT ratio in chronic hepatitis C patients. *Am J Gastroenterol* 96 : 918-919, 2001.
- 4) Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS : A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38 : 518-526, 2003.
- 5) Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, Fontaine H, Pol S : FIB-4 : an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology* 46 : 32-36, 2007.
- 6) Sandrin L, Tanter M, Gennisson JL, Catheline S, Fink M : Shear elasticity probe for soft tissues with 1-D transient elastography. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 49 : 436-446, 2002.
- 7) Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, Darriet M, Couzigou P, De Ledinghen V : Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 128 : 343-350, 2005.
- 8) Pylsopoulos NT, Reddy KR : Extrahepatic manifestations of chronic viral hepatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 3 : 71-78, 2001.

(平成22. 9.22受付, 22.12.13受理)

C型性肝炎に対するインターフェロン療法における
治療効果に影響する因子の検討

—当院において10年間に経験した331例の成績から—

森原 大輔	西澤 新也	福永 篤志
四本かおる	久能志津香	櫻井 邦俊
平野 玄竜	岩下 英之	上田 秀一
横山 圭二	坂本 雅晴	阿南 章
竹山 康章	入江 真	岩田 郁
釈迦堂 敏	早田 哲郎	向坂彰太郎

福岡大学医学部消化器内科

Daisuke MORIHARA, Shinya NISHIZAWA, Atsushi FUKUNAGA,
Kaoru YOTSUMOTO, Shizuka KUNO, Kunitoshi SAKURAI,
Genryu HIRANO, Hideyuki IWASHITA, Shuichi UEDA,
Keiji YOKOYAMA, Masaharu SAKAMOTO, Akira ANAN,
Yasuaki TAKEYAMA, Makoto IRIE, Kaoru IWATA,
Satoshi SHAKADO, Tetsuro SOHDA and Shotaro SAKISAKA

Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学医学紀要
第38巻第1号別冊
平成23年3月

Evaluation of the Factors Influencing the Response to Interferon Therapy for Chronic Hepatitis C —Clinical Outcomes of 331 Cases Over the Past Decade—

Daisuke MORIHARA, Shinya NISHIZAWA, Atsushi FUKUNAGA,
Kaoru YOTSUMOTO, Shizuka KUNO, Kunitoshi SAKURAI,
Genryu HIRANO, Hideyuki IWASHITA, Shuichi UEDA,
Keiji YOKOYAMA, Masaharu SAKAMOTO, Akira ANAN,
Yasuaki TAKEYAMA, Makoto IRIE, Kaoru IWATA,
Satoshi SHAKADO, Tetsuro SOHDA and Shotaro SAKISAKA

Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Abstract : We examined the factors influencing the response to interferon (IFN) therapy for patients with chronic hepatitis C who were treated in our department over the past decade. **Subjects and Methods :** Between April 2000 and March 2010, a total of 451 patients with chronic hepatitis C underwent IFN therapy in our department. The factors influencing the response to interferon (IFN) therapy were analyzed in 331 cases. Furthermore, 84 cases that had undergone pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin combination therapy were examined for an association between amino acid (aa) substitution in the hepatitis C virus (HCV) core region and efficacy of IFN therapy. **Results :** The average age of the 331 patients was 54.8 years old, and 62.9% had IFN therapy-resistant type HCV of serotype 1, and a high serum HCV-RNA level. The sustained virological response (SVR) of patients with HCV serotype 1 and a high serum HCV-RNA level was 18.2% in those who received IFN monotherapy, 22.9% for IFN+ribavirin combination therapy, 25.0% for PEG-IFN monotherapy, and 43.0% in the patients who received PEG-IFN+ribavirin combination therapy. Multivariate analysis identified non-serotype 1, a low serum HCV-RNA level, PEG-IFN+ribavirin combination therapy, and age(<57) as significant determinants of a SVR. Furthermore, the substitution of aa 70 in the HCV core region was an independent risk factor for a non-virological response. **Conclusions :** The efficacy of IFN therapy has improved dramatically over the past decade. Appropriate therapy for individual cases may be possible by considering the patient's HCV serotype, virus titer, age, IFN treatment method, and whether aa substitution of the core region is present.

Key words : Chronic hepatitis C, Interferon, Sustained virological response, Non-virological response

C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法における 治療効果に影響する因子の検討

— 当院において10年間に経験した331例の成績から —

森原 大輔	西澤 新也	福永 篤志
四本かおる	久能志津香	櫻井 邦俊
平野 玄竜	岩下 英之	上田 秀一
横山 圭二	坂本 雅晴	阿南 章
竹山 康章	入江 真	岩田 郁
釈迦堂 敏	早田 哲郎	向坂彰太郎

福岡大学医学部消化器内科

要旨：目的：当科での最近10年間のC型慢性肝炎患者に行われた、インターフェロン（IFN）療法の治療効果に影響を与える因子について検討した。対象と方法：2000年4月から2010年3月までの10年間に於いて、当科でIFN治療を行ったC型慢性肝炎患者451例のうち、解析可能であった331例において、IFN療法の治療効果に影響する因子について、統計学的に検討を行った。また、PEG-IFN（PEG-IFN）+リバビリン併用療法を行った84例については、C型肝炎ウイルス（HCV）コア領域のアミノ酸配列とIFN治療効果との関係についても検討した。結果：331例のIFN導入時平均年齢は54.8歳、IFN治療難治タイプ（著効率50%以下）とされるHCV serotype 1型かつ高ウイルス量例が62.9%を占めていた。HCV serotype 1型、高ウイルス量例におけるIFN治療別著効率は、IFN単独療法が18.2%、IFN+リバビリン併用療法が22.9%、PEG-IFN単独療法が25.0%、PEG-IFN+リバビリン併用療法が43.0%であった。IFN治療における著効（SVR）に寄与する因子は、多変量解析の結果、non-serotype 1型、低ウイルス量、治療法（PEG-IFN+リバビリン併用療法）、年齢（57歳未満）が独立因子として抽出された。また、HCVコア領域の70番目のアミノ酸変異は、治療無効となる独立因子であった。結論：この10年間に於けるIFN治療法は飛躍的に向上した。IFN治療を行う際は、HCV遺伝子型、ウイルス量、年齢、治療法、ウイルス側の遺伝子多型といったSVRに影響する因子を検討することにより、個々の症例に最適な治療ができると考えられた。

牽引用語：C型慢性肝炎、インターフェロン、Sustained virological response、Non-virological response

1. はじめに

我が国では、年間約3万5千人が肝臓で死亡しており、その多くはC型肝炎ウイルス（HCV）が原因である。我が国のC型肝炎患者は高齢化しており、他の先進国と異なりその発癌リスクが高い¹⁾。本邦では1992年にインターフェロン（IFN）治療が認可され、その後はIFNがC型肝炎治療の中心的な役割を果たしてきた。IFN治療は、HCVの増殖を抑制する唯一の薬剤である。IFN治療によってHCVが排除できれば、肝線維化の進行は抑制され、発癌率も顕著に低下させることが可能である²⁾。

2000年4月、福岡大学医学部に新規講座として第3内科（現、消化器内科）が誕生して以来、当科では肝炎、

肝臓の撲滅を目指して様々な治療を行ってきた。今回、当科開講からの10年間に行ったC型肝炎治療について、治療効果に影響する因子を検討したので報告する。また、近年、HCVコア領域の70番目のアミノ酸（Core aa70）置換の存在が、IFN治療効果と関連していることが報告³⁾されており、当科でもHCV遺伝子解析を行った。この遺伝子解析と治療効果についての検討も加えて報告する。

2. 対象と方法

2-1. 対象患者

2000年4月から2010年3月までの10年間に、当科でIFN治療を行ったC型肝炎患者451例を対象とした。451例のうち、転居や他院での加療などにより follow-

up ができなくなった症例が39例、現在も治療継続中のために IFN 効果が未判定である症例が36例、および詳細不明または記録がない症例が45例、存在していた（図1）。これらを除外し、HCV 遺伝子型、HCV ウイルス量の測定、および IFN 治療効果の判定が行われ解析可

能であった331例の患者背景を表1に示す。

IFN 導入時の平均年齢は、54.8歳（男：54.0歳、女：55.7歳）であった。HCV 遺伝子型と HCV 遺伝子定量が判定可能であった326例（判定不能であった5例を除く）の内訳を、表2に示す。HCV 遺伝子型は、serotype 1

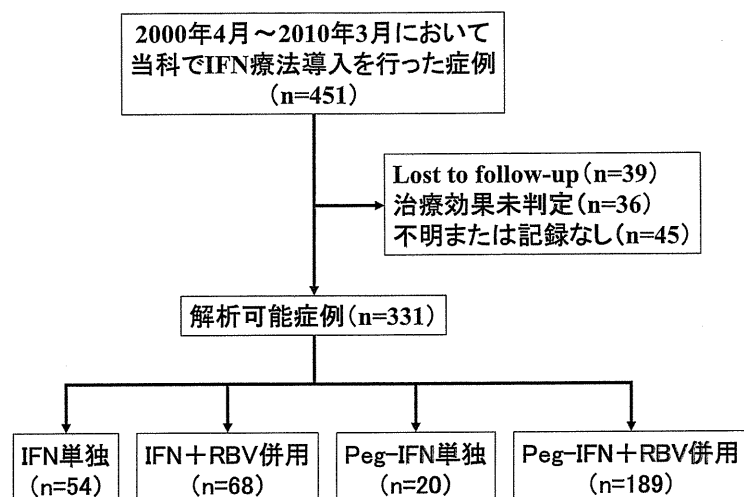


図1 10年間における当科でインターフェロン（IFN）療法を行った症例の内訳

表1

患者背景 (n=3331)		
性別 (M : F)	179 : 152	
IFN 導入年齢*	54.8 (20-80)	
IFN 治療法	IFN 単独	54 (16.3%)
	IFN+リバビリン	68 (20.5%)
	PEG-IFN 単独	20 (6.0%)
	PEG-IFN+リバビリン	89 (57.1%)
IFN 治療効果	SVR	178 (53.8%)
	Non SVR	153 (46.2%)
	(無効：68, 再燃：53, 中止：32)	
HCV 遺伝子	Serotype 1	217 (65.6%)
	Serotype 2	109 (32.9%)
	判定不能	5 (1.5%)
HCV ウイルス量	高ウイルス量	285 (86.1%)
	低ウイルス量	46 (13.9%)

*中央値 (min, max), IFN ; interferon, SVR ; sustained virological response

表2 当科における HCV 遺伝子型とウイルス量の割合

	Serotype 1 型 217人 (66.6%)	Serotype 2 型 109人 (33.4%)
高ウイルス量* 281人 (86.2%)	62.9% (205人)	23.3% (76人)
低ウイルス量 45人 (13.8%)	3.7% (12人)	10.1% (33人)

HCV 遺伝子型が判定可能であった326例での検討（判定不能であった5例を除く）

*HCV RNA 量が、1Meq/ml 以上 or 100KIU/ml 以上 or 5.0Log IU/ml 以上

型が217人 (66.6%), serotype 2型が109人 (33.4%) であった。HCV 遺伝子定量は、高ウイルス量 (HCV RNA 量: 1 Meq/ml 以上 (bDNA 法) or 100KIU/ml 以上 (RT-PCR 法)) or 5.0Log IU/ml 以上 (リアルタイム RT-PCR 法)) 症例が281人 (86.2%), 低ウイルス量 (HCV RNA 量: 1 Meq/ml 未満 or 100KIU/ml 未満 or 5.0Log IU/ml 未満) 症例が45例 (13.8%) であった。IFN 治療に難治性 (著効率50%以下) である serotype 1 型かつ高ウイルス量症例が、205人 (62.9%) と多くを占めていた。

2-2. IFN 療法

IFN 療法は、IFN 単独療法、IFN+リバビリン併用療法、PEG-IFN 単独療法、PEG-IFN+リバビリン併用療法の4種類に分類された。IFN 単独療法は、IFN- α 製剤を週3回、筋肉内または皮下注射にて投与した (治療期間: 12~24週間)。IFN+リバビリン併用療法は、IFN- α 製剤を週3回、筋肉内または皮下注射にて投与し、これにリバビリン内服を併用した (投与期間: 24週間)。PEG-IFN 単独療法は、PEG-IFN- α 製剤を週1回、皮下注射にて投与した (投与期間: 24~24週間)。PEG-IFN+リバビリン併用療法は、PEG-IFN- α 製剤を週1回、皮下注射し、これにリバビリン内服を併用した (投与期間: 24~72週間)。

この10年間に於いて、IFN 単独療法が54例 (16.3%)、IFN+リバビリン併用療法が68例 (20.5%)、PEG-IFN

単独療法が20例 (6.0%)、PEG-IFN+リバビリン併用療法が189例 (57.1%) に行われた。年次別にみた IFN 治療の実施推移を、図2に示す。

2-3. IFN 治療効果判定

IFN 治療効果判定は、治療終了6ヶ月後に行い、HCV RNA を検出しないものを著効 (SVR) とした。

2-4. HCV コア領域のアミノ酸配列解析

PEG-IFN+リバビリン併用療法を行った189例のうち、serotype 1 型、高ウイルス量、および解析可能であった84例を対象とした。HCV Core aa70 の置換については、ダイレクトシーケンス法にて解析した⁴⁾。Core aa70 が arginin (R) であるものを“置換なし (wild type)”とし、glutamine (Q) もしくは histidine (H) に置換されているものを“置換あり (mutant type)”とした。

2-5. 統計

IFN 治療効果に及ぼす解析項目として、年齢、性別、IFN 治療方法、HCV 遺伝子型、HCV ウイルス量、HCV Core aa70 アミノ酸置換有無につき検討した。統計学的検討は、Mann-Whitney U 検定、 χ^2 検定により行い、 $P < 0.05$ を有意とした。統計解析は、SPSS software (SPSS, Chicago, IL, USA) を使用した。

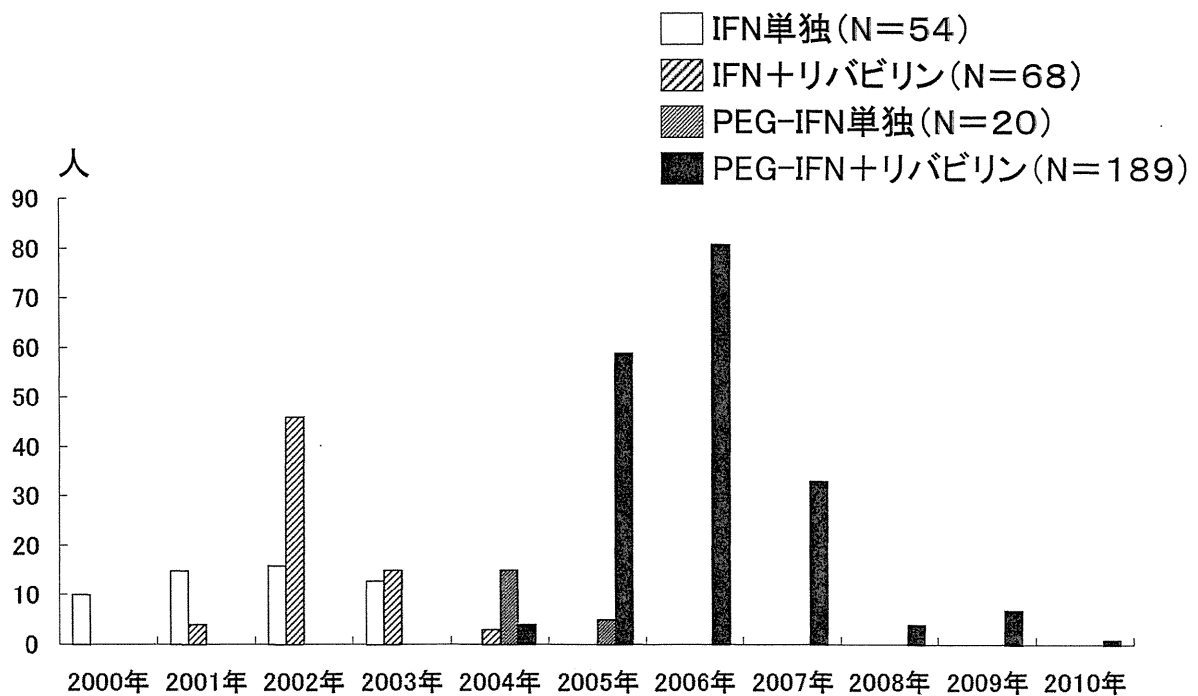


図2 C型慢性肝炎治療の年次推移

3. 結 果

3-1. IFN 治療効果との関係

(1) 年齢別にみた IFN 治療効果

331例中213例 (64.4%) が、50歳から69歳の間に IFN が導入されていた (図3)。また、年齢が高くなるほど、IFN 著効率が低下する傾向であった (図4)。IFN 非著効例と IFN 著効例に分けて年齢分布を比較すると、IFN 非著効例では平均年齢57.7歳、IFN 著効例では平均年齢52.3歳であり、IFN 非著効例では有意に高齢であった ($P < 0.001$, 図5)。

また、この10年間で上半期 (2000年~2004年) と下半期 (2005年~2009年) に分けて IFN 導入時平均年齢を検討した結果、52.3歳から56.4歳へと有意に患者高齢化が進んでいた ($P = 0.002$; 図6)。

(2) HCV 遺伝子型・ウイルス量別にみた IFN 著効率 (表3)

HCV 遺伝子型別に IFN 著効率をみた結果、HCV serotype 1型は serotype 2型より有意に IFN 著効率が低率であった (serotype 1型: serotype 2型=40.1%: 80.7%, $P < 0.001$)。また、HCV ウイルス量別にみた結果、高ウイルス量症例は低ウイルス量症例より有意に IFN 著効率が低率であった (高ウイルス量: 低ウイルス量=48.8%: 84.4% ($P < 0.001$))。さらに、HCV serotype 1型でかつ高ウイルス量症例であれば、IFN 著効率37.1%であり、他のタイプと比較して最も低い IFN 著効率であった ($P < 0.001$)。

(3) 治療法別にみた IFN 治療効果

IFN に難治性である HCV serotype 1型、高ウイルス量症例における治療別著効率を図7に示す。IFN 単

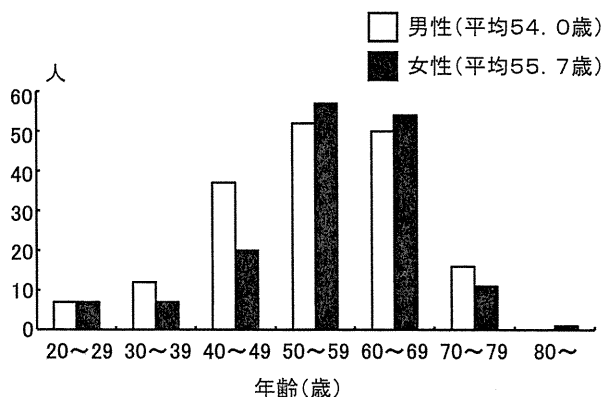


図3 当科におけるインターフェロン導入時年齢の分布

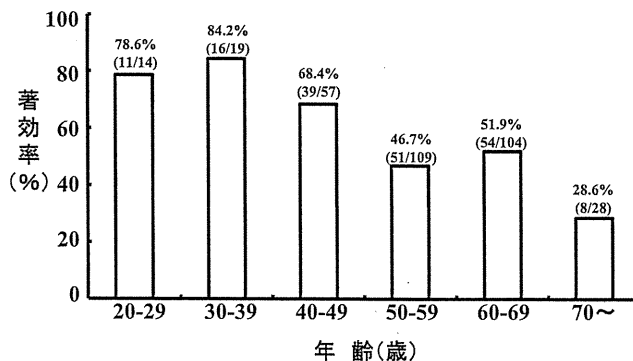


図4 年齢別にみた IFN 著効率

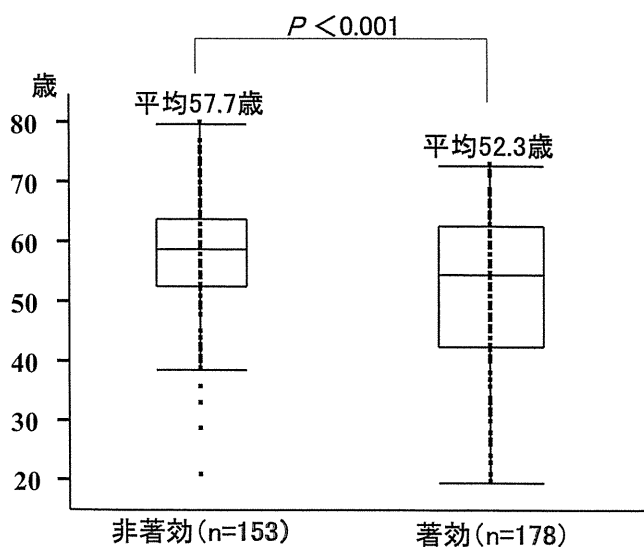


図5 年齢と IFN 治療効果の関係

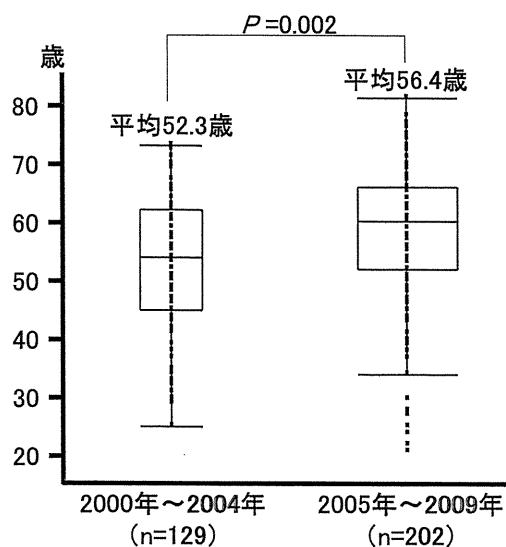


図6 10年間にわたる上半期・下半期での患者年齢推移

表3 HCV 遺伝子型・ウイルス量別にみた IFN 著効率

	Serotype 1 型 40.1% (87/217)	Serotype 2 型 80.7% (88/109)
高ウイルス量 48.8% (137/281)	37.1% (76/205)	80.3% (61/76)
低ウイルス量 84.4% (38/45)	91.7% (11/12)	81.8% (27/33)

HCV 遺伝子型が判定可能であった326例での検討（判定不能であった5例を除く）
IFN 著効率%（著効者数/総数）

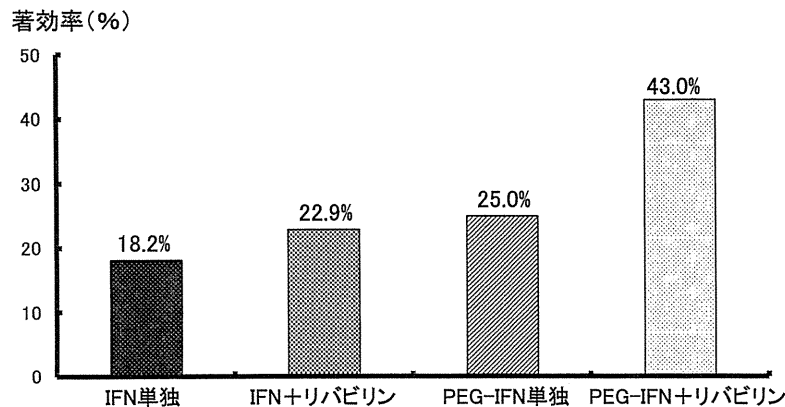


図7 治療別におけるC型慢性肝炎 (Serotype 1 型, 高ウイルス量症例) の著効率

表4 C型慢性肝炎治療における SVR に寄与する因子 (多変量解析)

Factor	Odds ratio (95% C.I.)	P
Serotype 1 型	0.184 (0.102-0.331)	<0.001
高ウイルス量	0.214 (0.083-0.551)	0.001
Peg-IFN+リバビリン療法	2.368 (1.369-4.095)	0.002
年齢57歳以上	0.529 (0.318-0.880)	0.014

独療法が18.2%, IFN+リバビリン併用療法が22.9%, PEG-IFN 単独療法が25.0%, PEG-IFN+リバビリン併用療法が43.0%であった。PEG-IFN+リバビリン併用療法は他の治療法と比較して、有意に著効率が上がった (P=0.001)。

3-3. C型慢性肝炎治療効果に影響する因子

当科で IFN 療法を行った331例における SVR に寄与する因子について、多変量解析を行った結果を表4に示す。多変量解析の結果、HCV 遺伝子型、ウイルス量、IFN 治療法 (PEG-IFN+リバビリン併用療法)、年齢が SVR に寄与する独立因子として抽出された。つまり、C型肝炎治療において治癒しやすいタイプは、①ウイルス側の因子として HCV 遺伝子型が non-serotype 1 型、低ウイルス量であること、②宿主側因子として若年者 (57歳未満) であること、③治療側因子として PEG-IFN+リバビリン併用療法であることが重要な因子で

あった。

3-4. PEG-IFN+リバビリン併用療法の治療成績

図8に、C型慢性肝炎 (高ウイルス量症例) に対する PEG-IFN+リバビリン併用療法の治療成績を serotype 別に示す。Serotype 1 型でかつ高ウイルス量症例における著効率は43.0%, serotype 2 型でかつ高ウイルス量症例における著効率は83.7%であった (P<0.001)。Serotype 1 型でかつ高ウイルス量症例は、serotype 2 型症例と比べ、再燃率 (24.4%), 治療経過中も HCV RNA が一度も陰性化しない無効率 (12.6%), および副作用などによる中止率 (20.0%) が有意に高かった。

3-5. HCV 遺伝子解析から見た治療効果

図9に、PEG-IFN+リバビリン併用療法を行った84例 (serotype 1 型, 高ウイルス量) における、HCV Core aa70 置換の有無における PEG-IFN+リバビリン併用

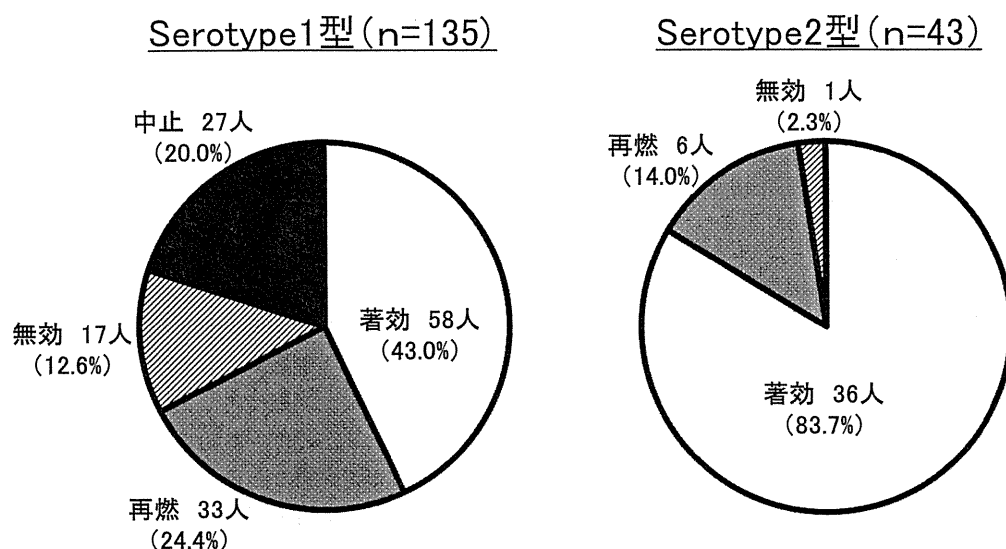


図8 当科におけるC型慢性肝炎(高ウイルス量症例)の治療成績
～PEG-IFN+リバビリン併用療法 (n=178)～

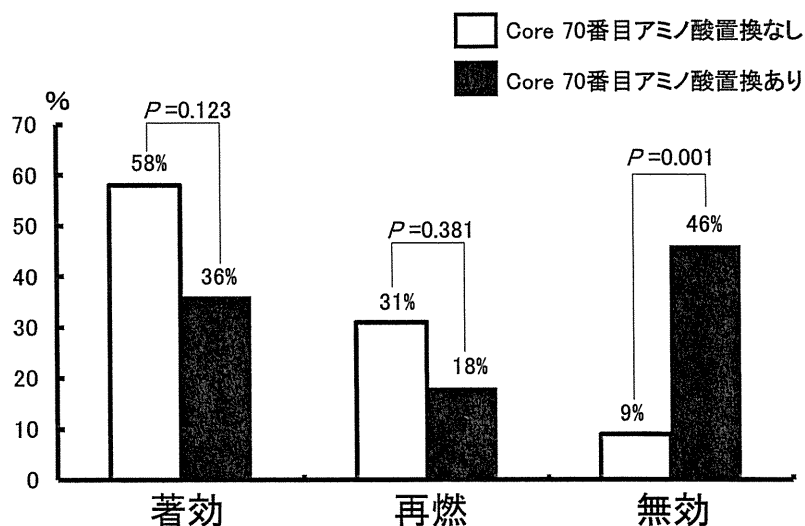


図9 HCV Core region の70番目アミノ酸置換有無による治療効果
～PEG-IFN+リバビリン併用療法 (n=84)～

療法の治療効果を示す。HCV Core aa70 置換があると、著効率36%と低値であり、IFN 治療を行うも、治療中に HCV RNA が一度も陰性化しない無効例 (NVR) を46% (P=0.001) と高率に認めた。また、この NVR に寄与する因子について多変量解析を行った結果、HCV Core aa70 置換が独立因子として抽出された (odds ratio 6.6, P=0.002; 表 5)。

4. 考 察

IFN 治療効果は、HCV 遺伝子型およびウイルス量により大きく異なる。我が国に最も多く存在する sero-

type 1 型は、serotype 2 型と比較して IFN 抵抗性である。また、HCV ウイルス量も、高ウイルス量症例は低ウイルス症例と比べると IFN 抵抗性である。我が国の C 型肝炎の特徴は、70%近くが IFN 抵抗性の serotype 1 型かつ高ウイルス量例である。また、欧米と比して患者平均年齢が10～15歳高齢であり、肝発癌が極めて高いことが特徴である¹⁾。実際、当科におけるこの10年間の C 型慢性肝炎症例について検討した結果、大半が serotype 1 型かつ高ウイルス量症例であり、IFN 治療に対して難治性タイプであった。また、患者年齢も高齢化が進んでおり、我が国の特徴と合致していた。

C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法は、この10年間