

図2 反応プロトコール

HCV 抗体（以下ルミスポット）（栄研化学株式会社）を栄研化学株式会社内で行い、ルミパルス® II オーン® HCV（以下ルミパルス）（オーソ・クリニカル・ダイアグノスティクス株式会社）を外部検査センターに依頼し、測定した。

### 3. イムノブロット法および CLIA 法

乖離検体例の分析にイムノブロット法であるカイロン HCV RIBA テスト III（以下 RIBA テスト）（オーソ・クリニカル・ダイアグノスティクス株式会社）および CLIA 法のアーキテクト®・HCV（以下アーキテクト）（アボット ジャパン株式会社）を用い、これらは外部検査センターに依頼し、測定した。

### 4. HCV 抗原検査および HCV 核酸増幅検査

肝炎ウイルス検診等実施要領による分類のうち、HCV 抗原検査に BLEIA® ‘栄研’ HCV 抗

原<sup>3)</sup>（栄研化学株式会社）、HCV 核酸増幅検査にコバス TaqMan® HCV 「オート」（ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社）を使用した。BLEIA® ‘栄研’ HCV 抗原は栄研化学株式会社内で行い、コバス TaqMan® HCV 「オート」は外部検査センターに依頼し、測定した。

## III. 結 果

### 1. 同時再現性・日差再現性の検討

同時再現性試験は、血清検体 4 例について 10 重測定を行った。その結果、陰性コントロール (N) はすべて陰性を示し、陽性コントロール (L, M, H) の変動係数 (CV) は 1.5~4.6% を示した (表 1)。

日差再現性試験は、血清検体 4 例について 3 重測定を 9 日間行った。その結果、陰性コントロール (N) は 9 日間すべて陰性を示し、陽性

表 1 同時再現性 (単位: COI)

測定数	N	L	M	H
1	(-)	3.15	43.50	236.85
2	(-)	3.11	42.89	243.29
3	(-)	2.99	43.13	239.75
4	(-)	3.05	43.89	240.15
5	(-)	3.07	43.29	250.14
6	(-)	2.98	43.61	248.87
7	(-)	3.00	43.91	230.12
8	(-)	2.98	44.87	244.04
9	(-)	3.40	43.96	241.57
10	(-)	2.88	42.46	254.07
Mean		3.06	43.55	242.89
SD		0.14	0.67	6.94
CV (%)		4.6	1.5	2.9

表 2 日差再現性 (単位: COI)

測定日	N	L	M	H
1	(-)	3.44	47.49	242.00
2	(-)	3.22	44.80	233.78
3	(-)	3.14	41.32	226.44
4	(-)	3.32	43.98	244.15
5	(-)	3.08	44.00	234.72
6	(-)	3.34	43.43	230.13
7	(-)	3.16	43.48	223.70
8	(-)	3.02	41.16	238.08
9	(-)	3.28	41.88	237.41
Mean		3.22	43.50	234.49
SD		0.14	1.97	6.82
CV (%)		4.2	4.5	2.9

コントロール (L, M, H) の 3 重測定平均値における 9 日間の変動係数は 2.9~4.5% を示した (表 2)。

## 2. 希釈直線性試験

陽性コントロール 3 例 (血清検体 1~3) を HCV 抗体陰性ヒトプール血清で 16 倍まで希釈して測定し、希釈直線性を確認した。希釈検体は、いずれも原点を通る良好な直線性を示した (図 3)。

## 3. C 型・非 C 型肝炎患者検体での検討

国立長崎医療センターで C 型肝炎と診断した治療前の検体 100 例および非 C 型肝炎と診断した検体 80 例を用いて、診断結果との正診率を確認した。その結果、BLEIA 法の感度、特異度および正診率はそれぞれ 100.0%, 97.5% および 98.9% (表 3-1), ルミスポットの感度、特異度および正診率はそれぞれ 100.0%, 100.0% および 100.0% (表 3-2), ルミパルスの感度、特異度および正診率はそれぞれ 100.0%, 96.3% および 98.3% であった (表 3-3)。

HCV の Genotype については、BLEIA 法を含めルミスポット、ルミパルス法とも、1a, 1b, 2a および 2b に反応し検出可能であった。

## 4. 他法との相関および乖離検体例の分析

国立長崎医療センターにて C 型肝炎と診断した検体 100 例および非 C 型肝炎と診断した

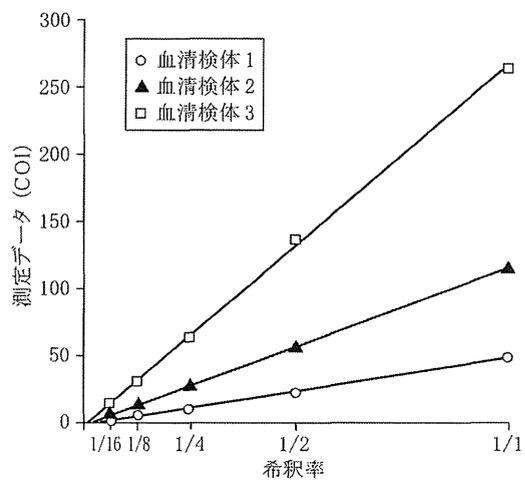


図 3 希釈試験

検体 80 例を用いて、CLEIA 法との相関性を確認した。その結果、ルミスポットとの相関性 (n=180) は、定性判定において一致率 98.9% (178/180) と高い相関性を示した (表 4-1)。また、ルミパルスとの相関性 (n=180) は、定性判定において一致率 97.2% (175/180) と高い相関性を示した (表 4-2)。

それぞれの方法で判定が乖離した 5 例について、RIBA テストおよびアーキテクトの測定結果を確認したところ、非 C 型肝炎検体 No. 9, No. 61 はルミパルス単独陽性、No. 42 は BLEIA

表 3-1 診断結果と BLEIA 法の評価

		診断		合計
		C 型肝炎	非 C 型肝炎	
BLEIA 法	陽性	100	2	102
	陰性	0	78	78
合計		100	80	180

感 度 : 100.0%  
 特異度 : 97.5%  
 正診率 : 98.9%

表 3-2 診断結果と CLEIA 法 (ルミスポット) の評価

		診断		合計
		C 型肝炎	非 C 型肝炎	
CLEIA 法 (ルミスポット)	陽性	100	0	100
	陰性	0	80	80
合計		100	80	180

感 度 : 100.0%  
 特異度 : 100.0%  
 正診率 : 100.0%

表 3-3 診断結果と CLEIA 法 (ルミパルス) の評価

		診断		合計
		C 型肝炎	非 C 型肝炎	
CLEIA 法 (ルミパルス)	陽性	100	3	103
	陰性	0	77	77
合計		100	80	180

感 度 : 100.0%  
 特異度 : 96.3%  
 正診率 : 98.3%

表 4-1 CLEIA 法 (ルミスポット) と BLEIA 法の相関

		CLEIA 法 (ルミスポット)		合計
		陽性	陰性	
BLEIA 法	陽性	100	2	102
	陰性	0	78	78
合計		100	80	180

感 度 : 100.0%  
 特異度 : 97.5%  
 一致率 : 98.9%

表 4-2 CLEIA 法 (ルミパルス) と BLEIA 法の相関

		CLEIA 法 (ルミパルス)		合計
		陽性	陰性	
BLEIA 法	陽性	100	2	102
	陰性	3	75	78
合計		103	77	180

感 度 : 97.1%  
 特異度 : 97.4%  
 一致率 : 97.2%

法とアーキテクトの2試薬で陽性、No.44はBLEIA法単独陽性、No.67はルミパルスとアーキテクトの2試薬で陽性かつRIBAテストで保留判定であった(表4-3)。乖離例に何らかの傾向はみられず、またいずれもカットオフ付近の陽性であった。

5. セロコンバージョンパネル等を用いた HCV 抗体の検出性能の確認

SeraCare Life Sciences 社 (アメリカ) から入

表 4-3 判定が乖離した検体の測定結果

非 C 型肝炎検体	BLEIA 法 (COI)	ルミスポット (Index)	ルミパルス (COI)	アーキテクト (S/CO)	RIBA テスト					判定
					NS4	NS3	Core	NS5	SOD	
No.9	0.02	0.2	1.6	0.10	-	-	-	+/-	-	陰性
No.42	1.24	0.4	0.5	1.47	-	-	-	-	-	陰性
No.44	1.46	0.2	0.1	0.05	-	+/-	+/-	+/-	-	陰性
No.61	0.06	0.5	3.1	0.08	-	-	-	-	-	陰性
No.67	0.02	0.2	1.1	1.55	-	2+	-	-	-	保留

表 5-1 セロコンバージョンパネル PHV901 の測定結果

Member ID	Days Since 1st Bleed	SeraCare Life Sciences 社添付データシート					BLEIA 法	
		Ortho RIBA 3.0					(COI)	判定
		NS4	NS3	CORE	NS5	Result		
01	0	-	-	-	-	NEG	0.12	-
02	72	-	-	-	-	NEG	0.10	-
03	104	3+	4+	-	+/-	POS	10.25	+
04	106	3+	4+	-	+/-	POS	9.05	+
05	111	3+	4+	-	+/-	POS	11.28	+
06	113	3+	4+	-	+/-	POS	12.96	+
07	138	4+	4+	-	1+	POS	109.63	+
08	146	4+	4+	-	1+	POS	82.80	+
09	166	4+	4+	-	2+	POS	310.47	+
10	173	4+	4+	-	2+	POS	280.45	+
11	209	4+	4+	+/-	2+	POS	OR	+

※OR : 400 以上

+ : 陽性, - : 陰性

表 5-2 セロコンバージョンパネル PHV904 の測定結果

Member ID	Days Since 1st Bleed	SeraCare Life Sciences 社添付データシート					BLEIA 法	
		Ortho RIBA 3.0					(COI)	判定
		NS4	NS3	CORE	NS5	Result		
01	0	-	-	-	-	NEG	0.09	-
02	2	-	-	-	-	NEG	0.06	-
03	7	-	-	-	-	NEG	0.18	-
04	9	-	+/-	-	-	NEG	0.68	-
05	14	-	1+	-	-	IND	4.44	+
06	21	-	2+	-	-	IND	5.04	+
07	23	-	3+	-	-	IND	5.89	+

+ : 陽性, - : 陰性

表 5-3 セロコンバージョンパネル PHV905 の測定結果

Member ID	Days Since 1st Bleed	SeraCare Life Sciences 社添付データシート					BLEIA 法	
		Ortho RIBA 3.0					(COI)	判定
		NS4	NS3	CORE	NS5	Result		
01	0	-	-	-	-	NEG	0.02	-
02	4	-	-	-	-	NEG	0.04	-
03	7	-	-	-	-	NEG	0.07	-
04	11	-	1+	-	-	IND	0.25	-
05	14	-	1+	-	-	IND	0.38	-
06	18	-	1+	+/-	-	IND	0.66	-
07	21	-	2+	1+	-	POS	1.31	+
08	25	-	4+	4+	-	POS	10.14	+
09	28	-	4+	4+	-	POS	32.42	+

+ : 陽性, - : 陰性

表 5-4 セロコンバージョンパネル PHV906 の測定結果

Member ID	Days Since 1st Bleed	SeraCare Life Sciences 社添付データシート					BLEIA 法	
		Ortho RIBA 3.0					(COI)	判定
		NS4	NS3	CORE	NS5	Result		
01	0	+/-	4+	-	-	IND	1.15	+
02	2	+/-	4+	-	-	IND	1.63	+
03	7	2+	4+	-	-	POS	5.12	+
04	10	3+	4+	-	-	POS	7.70	+
05	14	4+	4+	-	-	POS	13.86	+
06	17	4+	4+	-	-	POS	22.93	+
07	21	4+	4+	-	-	POS	29.40	+

+ : 陽性, - : 陰性

表 5-5 セロコンバージョンパネル PHV907 の測定結果

Member ID	Days Since 1st Bleed	SeraCare Life Sciences 社添付データシート					BLEIA 法	
		Ortho RIBA 3.0					(COI)	判定
		NS4	NS3	CORE	NS5	Result		
01	0	-	-	-	-	NEG	0.07	-
02	4	-	-	-	-	NEG	0.06	-
03	7	-	-	-	-	NEG	0.06	-
04	13	-	-	1+	-	IND	1.39	+
05	18	-	+/-	4+	-	IND	10.22	+
06	21	-	1+	4+	-	POS	13.23	+
07	164	4+	4+	4+	3+	POS	142.90	+

+ : 陽性, - : 陰性

表 5-6 Low Titer Panel PHV105 の測定結果

Member ID	SeraCare Life Sciences 社添付データシート					BLEIA 法	
	Ortho RIBA 3.0					(COI)	判定
	NS4	NS3	CORE	NS5	Result		
01	3+	3+	2+	2+	POS	3.27	+
02	+/-	-	3+	1+	POS	28.06	+
03	+/-	1+	1+	+/-	POS	2.36	+
04	1+	3+	1+	1+	POS	4.26	+
05	+/-	1+	1+	+/-	POS	2.46	+
06	3+	1+	3+	+/-	POS	7.20	+
07	-	2+	-	-	IND	1.62	+
08	-	2+	-	+/-	IND	4.24	+
09	-	+/-	1+	-	IND	2.02	+
10	-	-	-	-	NEG	0.04	-
11	-	+/-	3+	-	IND	10.09	+
12	4+	2+	-	-	POS	5.89	+
13	-	2+	+/-	-	IND	3.07	+
14	-	3+	-	-	IND	0.65	-
15	-	2+	3+	-	POS	22.98	+

+ : 陽性, - : 陰性

表 5-7 Mixed Titer Panel PHV205 の測定結果

Member ID	SeraCare Life Sciences 社添付データシート					BLEIA 法	
	Ortho RIBA 3.0					(COI)	判定
	NS4	NS3	CORE	NS5	Result		
01	2+	2+	-	2+	POS	8.38	+
02	-	-	-	-	NEG	0.06	-
03	-	-	4+	1+	POS	28.54	+
04	-	2+	4+	-	POS	61.22	+
05	-	+/-	2+	-	IND	11.55	+
06	-	3+	-	-	IND	8.62	+
07	-	1+	2+	-	POS	5.42	+
08	+/-	2+	+/-	-	IND	2.33	+
09	2+	3+	-	-	POS	1.52	+
10	+/-	1+	2+	-	POS	10.57	+
11	-	4+	3+	3+	POS	173.41	+
12	1+	3+	1+	-	POS	2.82	+
13	2+	1+	3+	3+	POS	22.07	+
14	4+	4+	-	2+	POS	36.49	+
15	2+	3+	3+	2+	POS	8.49	+
16	1+	3+	3+	2+	POS	14.73	+
17	2+	2+	3+	-	POS	13.75	+
18	4+	4+	-	4+	POS	105.14	+
19	-	4+	4+	4+	POS	198.89	+
20	3+	3+	3+	-	POS	55.49	+
21	4+	4+	4+	4+	POS	OR	+
22	4+	4+	4+	-	POS	OR	+
23	3+	4+	4+	2+	POS	OR	+
24	4+	4+	4+	4+	POS	OR	+
25	-	-	-	-	NEG	0.05	-

※OR : 400 以上

+ : 陽性, - : 陰性

手した以下の HCV セロコンバージョンパネル (PHV901, PHV904, PHV905, PHV906, PHV907), Low Titer Panel (PHV105), Mixed Titer Panel (PHV205) を BLEIA 法にて測定し, 添付のデータシートにおける RIBA テストの測定結果と比較した (表 5-1~表 5-7)。RIBA テストで陽性の検体は陽性, 陰性の検体は陰性と判定し, 良好な相関を示した。

#### 6. 肝炎ウイルス検診等実施要領による分類

HCV 抗体検査に CLEIA 法 (ルミスポット) および BLEIA 法, HCV 抗原検査に BLEIA<sup>®</sup> '栄研' HCV 抗原, HCV 核酸増幅検査にコバス TaqMan<sup>®</sup> HCV 「オート」を用い, 肝炎ウイル

ス検診等実施要領による分類を行った (図 4-1, 図 4-2)。その結果, 「現在, C 型肝炎ウイルスに感染している可能性が極めて高い」と判定された検体と「現在, C 型肝炎ウイルスに感染していない可能性が極めて高い」と判定された検体は CLEIA 法と BLEIA 法間で完全に一致した。BLEIA 法で低力価となった検体の HCV 核酸増幅検査はすべて陰性となり, 中力価となった 5 例中 1 例が HCV 抗原陽性となり, および高力価となった 14 例中 13 例が HCV 抗原陽性となり, 残り 1 例は HCV 抗原, HCV 核酸増幅検査とも陰性となった。なお, BLEIA 法高力価で HCV 抗原および HCV 核酸増幅検査が陰性と

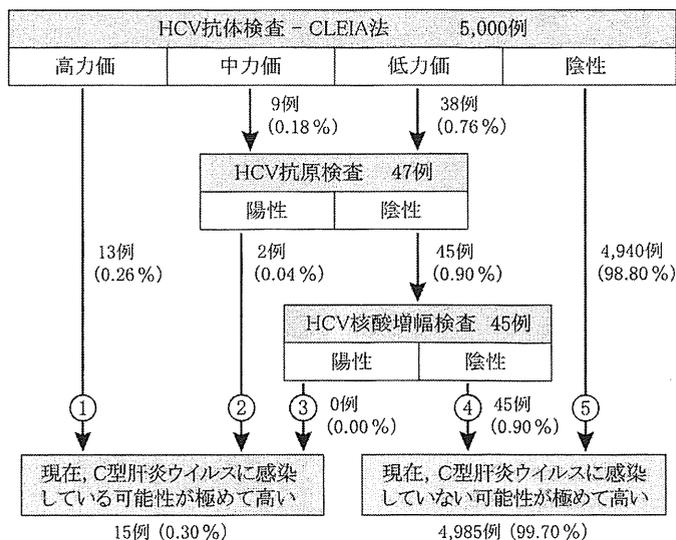


図 4-1 肝炎ウイルス検診等実施要領 (健発 0329 第 25 号) による分類結果 (CLEIA 法)

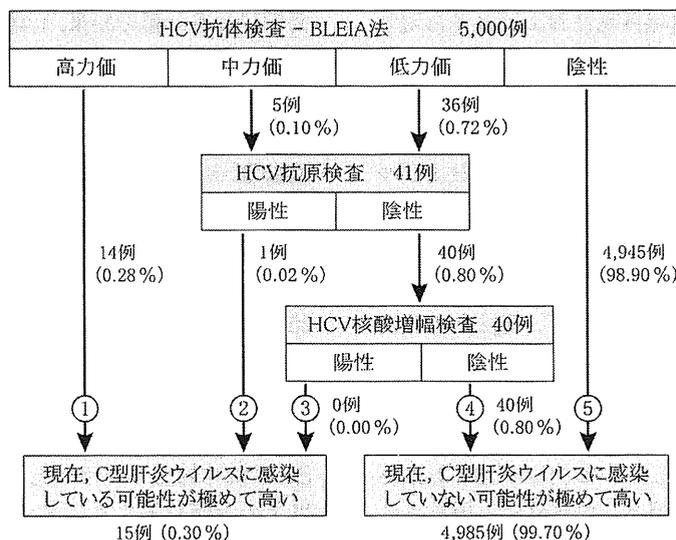


図 4-2 肝炎ウイルス検診等実施要領 (健発 0329 第 25 号) による結果 (BLEIA 法)

なった1例は、CLEIAの2法でも高力価を示し、またRIBAテストも陽性であった。さらに、平成25年4月改正の肝炎ウイルス検診等実施要領による分類では、図4-3に示す通りであり、図4-1に示す手順の相応する結果と完全に一致

した。

#### IV. 考 察

全自動生物化学発光免疫測定装置「BLEIA®-1200」の専用試薬「BLEIA® ‘栄研’ HCV 抗体」

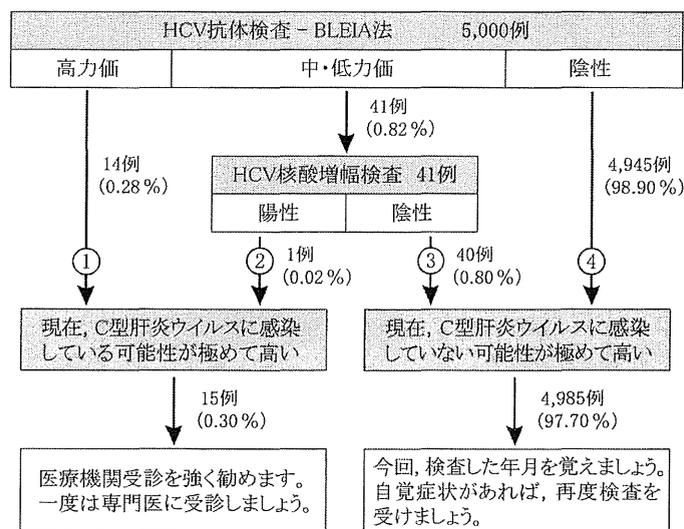


図 4-3 肝炎ウイルス検診等実施要領 (平成 25 年 4 月改正) による分類結果 (BLEIA 法)

を評価した結果, 同時再現性および日差再現性は 5% 以下と良好な再現性であり, 希釈試験でも良好な直線性を示した。C 型・非 C 型肝炎患者と診断した治療前の検体を用いた評価では, BLEIA 法, CLEIA 法のルミスポットおよびルミパルスにおいて 98.9%, 100% および 98.3% となり良好な正診率であった。また, BLEIA 法と既存の CLEIA 法の相関は 98.9% および 97.2% と良好な一致率であった。他法との相関において判定が乖離した 5 例については, BLEIA 法, ルミパルスの単独陽性, またはアーキテクトも陽性となる例で何らかの傾向は認められず, 各社の使用している抗原の差が各検体中の抗体の反応する差として現れたと推測された。

セロコンバージョンパネル 5 種および Low Titer Panel, Mixed Titer Panel において, BLEIA 法は RIBA テスト陽性の検体を陽性, 陰性の検体を陰性と判定したことから, 高い検出精度および各抗原エピトープへの広い反応性を確保し, かつ早期に HCV 抗体を検出する性能を有していると判断された。企業健診検体 5,000 例を対象にした肝炎ウイルス検診等実施

要領による分類の結果, 「現在, C 型肝炎ウイルスに感染している可能性が極めて高い」と判定された検体と「現在, C 型肝炎ウイルスに感染していない可能性が極めて高い」と判定された検体は HCV 抗体価の分類が可能な既存の CLEIA 法と完全に一致し, BLEIA 法の肝炎ウイルス検診等実施要領による分類は適切であると判断され十分適応可能である。さらに, 平成 25 年度に改正される検診等実施要領にも適応させた場合においても 23 年度の手順に相応する結果はそれぞれ一致した。そして, 本試薬は改正される検診等実施要領にも適応可能な HCV 抗体検査キットとして報告されている。以上の評価結果より, 本試薬を用いた HCV 抗体の検出精度は臨床および検診検体においても高いと判断される。

## 結 論

今回の検討結果より, BLEIA 法を測定原理とする第三世代の試薬「BLEIA® ‘栄研’ HCV 抗体」は, 基礎性能, 臨床検体を用いた診断性能および肝炎ウイルス検診等実施要領による分類の精度も高く, 良好な成績を示した。よって,

本試薬は、C型肝炎ウイルス感染診断の補助およびC型肝炎検診におけるHCV抗体の検出およびHCV抗体の検査に有用であると考えられた。

### 文 献

- 1) 田中榮司：HCV関連マーカー測定法の進歩. 臨床検査 46(3) : 243-250, 2002.
- 2) 秋山弘 他：ルミスポットLS-2000を使用したC型肝炎ウイルス検診の検討. 医学と薬学 51(4) : 605-610, 2004.
- 3) 八橋弘 他：全自動生物化学発光免疫測定装置「BLEIA<sup>®</sup>-1200」専用試薬「BLEIA<sup>®</sup> '栄研' HCV抗原」の臨床性能評価. 医学と薬学 68(1) : 157-167, 2012.
- 4) 安田清美 他：高感度HCVコア蛋白定量試薬のC型慢性肝炎診断および治療への適用. 医学と薬学 47(4) : 651-661, 2002.
- 5) 豊田成司 他：コバス TaqMan HCV「オート」によるC型慢性肝炎抗ウイルス療法時のウイルス動態と効果予測. 肝臓 49(7) : 297-306, 2008.
- 6) 田中純子 他：平成24年度厚生労働省科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業「肝炎ウイルス感染状況・長期経過と予後調査及び治療導入対策に関する研究, 総括・分担研究報告書2012.
- 7) Ohkuma H et al : Detection of luciferase having two kinds of luminescent colour based on optical filter procedure : application to an enzyme immunoassay. Luminescence 15(1) : 21-27, 2000.
- 8) Kajiyama N et al : Thermostabilization of firefly luciferase by a single amino acid substitution at position 217. Biochemistry 32(50) : 13795-13799, 1993.
- 9) Kajiyama N et al : Enhancement of thermostability of firefly luciferase from *Luciola lateralis* by a single amino acid substitution. Biosci Biotechnol Biochem 58(6) : 1170-1171, 1994.
- 10) Tatsumi H et al : Construction of biotinylated firefly luciferases using biotin acceptor peptides. Anal Biochem 243(1) : 176-180, 1996.

\* \* \*

## Faldaprevir (PI) + Deleobuvir (NNI) 併用療法

八橋 弘\* 中尾 瑠美子\*\* 木村 梨沙\*\* 小森 敦正\*

索引用語：Faldaprevir, Deleobuvir, SOUND-C 試験

## 1 はじめに

C型肝炎治療は、長くインターフェロン (IFN) を基本とした抗ウイルス治療が行われてきたが、IFNは副作用の出現が必発な薬剤であり、また患者の合併症の状況によっては、IFNを用いて治療を行うこと自体が禁忌であったり、相当のリスクを伴う例が散見される。

一方、Telaprevirは、単独投与でもHCVの増殖を顕著に抑制するHCVに特異的な抗ウイルス剤(Direct-acting Antiviral Agents: DAAs)として開発されたが、単独投与では、短期間に高頻度に薬剤耐性となることが知られている。そこでHCV増殖メカニズムを考慮したうえで、作用機序の異なるDAAsを複数組み合わせることでIFNを用いずともHCVが体内から排除されるかもしれないという発想からIFN-Free治療の開発試験のデザインが検討され、すでに複数の製薬企業から開発試験の成績が報告されている。

Faldaprevir (ファルダプレビルナトリウム: BI 201335) と Deleobuvir (BI 207127) は、Boehringer-Ingelheim社が開発したDAAsである。

本稿では、主にFaldaprevirとDeleobuvirとリバビリン(RBV)を用いたIFN-Free治療の開発試験の状況を概説する。

## 2 Faldaprevir (BI 201335) と Deleobuvir (BI 207127)

Faldaprevir (図1上) は、Boehringer-Ingelheim社が開発した第二世代HCV NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤であり、HCV genotype 1, 2, 4, 5, 6型に対して抗ウイルス活性を示す、1日1回の経口投与が可能な薬剤である。また、FaldaprevirとPegIFN/RBVによる3剤併用治療の臨床試験が現在進行中である。

Deleobuvir (図1下) は、C型肝炎ウイルス (HCV) のRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp) に対する可逆性の非ヌクレオシド系阻害剤で、経口投与が可能な薬剤である。

Hiroshi YATSUHASHI *et al*: Combination therapy by faldaprevir and deleobuvir

\*国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター [〒856-8562長崎県大村市久原2-1001-1]

\*\*同 治験管理室

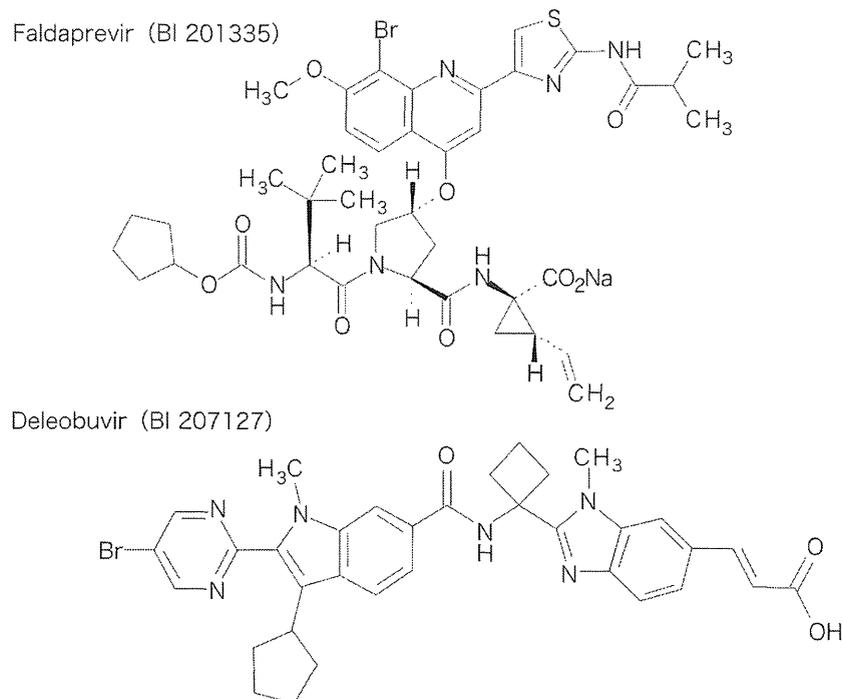


図1 Faldaprevir (BI 201335)とDeleobuvir (BI 207127)の構造

細胞を用いたアッセイにおいてEC<sub>50</sub>は、GT1aで23nM、GT1bで11nMと、RdRpに対して強力な阻害活性を示している。また、DeleobuvirとFaldaprevirの併用は、HCVに対して相加的な阻害作用を示し、耐性変異株の出現を抑制することが*in vitro*において確認されている。

### 3 SOUND-C1 試験 (図2)

FaldaprevirとDeleobuvirとリバビリンの3剤併用療法の治療初期4週間までの抗ウイルス効果と安全性を検討した開発試験がSOUND-C1試験である<sup>1)</sup>。

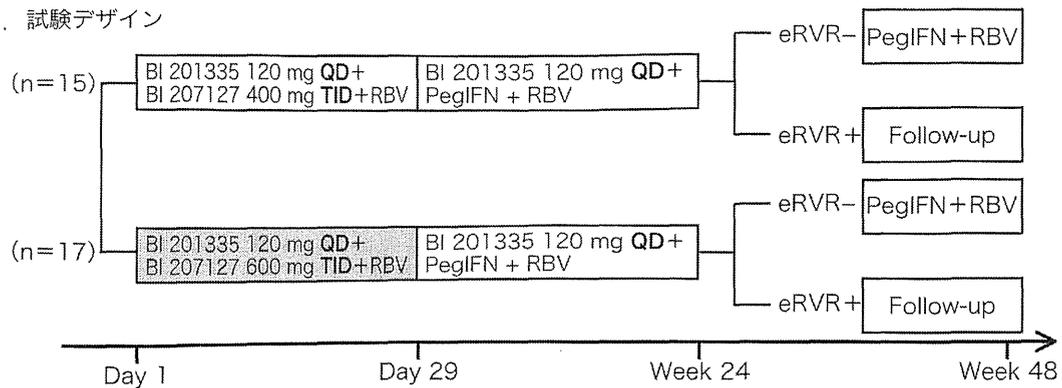
図2に示すようにFaldaprevirの投与量は1日1回120mgと固定したうえで、Deleobuvirの投与量を400mg1日3回投与群と600mg1日3回投与群の2群に設定して、その効果と安全性を比較検討したものである。本試験は、HCV-Genotype (GT) -1高ウイルス量の未治療

C型慢性肝炎患者を対象に、多施設、オープンラベル、ランダム化Phase I b試験として実施された。

薬剤投与方法は、4週間のFaldaprevir/Deleobuvir/RBVの3剤併用投与後、Faldaprevir 120mgとPegIFN/RBVで24週まで治療を継続し、Response-Guided TherapyとしてeRVR (extended rapid virological response : 本試験では、治療4週目でHCVRNA < 25 IU/mLでかつHCVRNAが治療5~18週間の期間は検出されない反応)を示したか否かで、さらに48週間までのPegIFN/RBV治療を継続する群を設定した。

Day 29での血中HCVRNA量が定量感度以下(LLOQ : < 25 IU/mL)を示した者の頻度は、Deleobuvir 400mg投与群では、GT-1a症例(N = 10)で60%、GT-1b症例(N = 5)で100%であったが、Deleobuvir 600mg投与群では、GT-1a症例(N = 8)で100%、GT-1b症例(N =

1. 試験デザイン



2. 治療成績：Day 29でのLLOQ (<25 IU/mL)の頻度

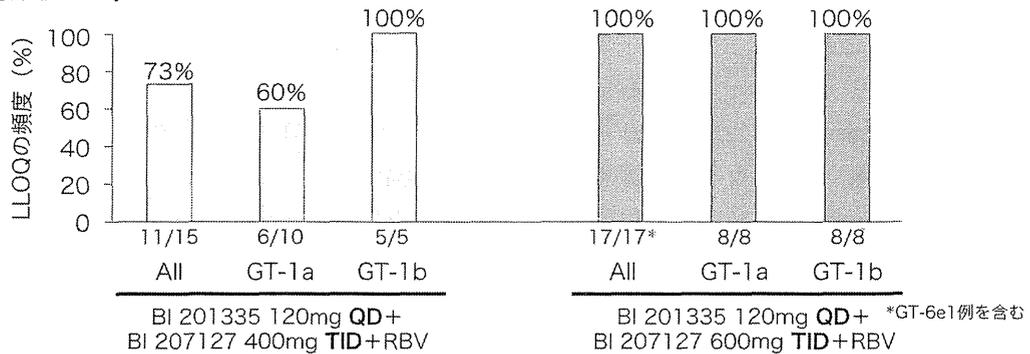


図2 SOUND-C1試験の概略(文献1から作成)

8)で100%と良好な抗ウイルス効果を示した。

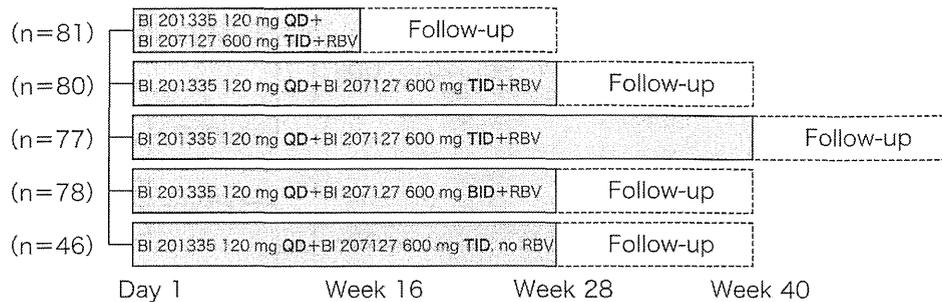
有害事象に関しては、軽度ないし中等度の消化器症状、皮疹、光線過敏症、高ビリルビン血症であり、重篤なものは1例もみられなかった。Deleobuvir 400 mg投与のGT-1a症例1例において、Day 22の時点でVirological Breakthroughが認められ、この症例はDay 30の時点で、NS3領域のR155Kの変異、またNS5B領域のP495Lの変異をともに認めた。なお、R155KはFaldaprevir、P495LはDeleobuvirで誘導される変異として知られている。

これらのSOUND-C1試験の結果からは、Deleobuvirの投与量は400 mgよりも600 mgが抗ウイルス効果の観点からは優れていると判断され、以後の開発試験でのDeleobuvirの投与量は600 mgで設定されている。

#### 4 SOUND-C2 試験

SOUND-C2試験は、本格的なIFN-Free治療の開発試験として、FaldaprevirとDeleobuvirとRBVの3剤併用療法の治療期間の設定、薬剤の投与方法、RBVの必要性などを検討する目的で、HCV GT-1高ウイルス量の未治療C型慢性肝炎患者を対象に、多施設、オープンラベル、ランダム化Phase II b試験として実施された<sup>2)</sup>。

対象症例は、HCV-GTのサブタイプとして、GT-1aとGT-1bの2群、また*IL28B*遺伝子多型についてもCCとnon-CCの2群に分けて、治療効果を評価できるようにデザインされ、主要エンドポイントは、治療終了後12週の時点でのウイルス陰性化(sustained



初日のみ投与量はBI 201335 : 240 mg, BI 207127 : 1,200 mgの倍量とする。  
 RBV投与量は体重75 kg未満の患者では1,000 mg/日, 体重75 kg以上では1,200 mg/日とする  
 BID, twice daily : 1日2回投与  
 QD, once daily : 1日1回投与  
 TID, three-times daily : 1日3回投与

図3 SOUND-C2試験 投与方法(文献2から作成)

virological response : SVR12)としている。

18歳から75歳までのGT-1未治療患者362名がエントリーされ, この中には慢性肝炎だけでなく肝硬変患者も含まれていた。治療期間, Deleobuvirの1日の服用の仕方, RBVの有無で, 下記の5群が設定された(図3)。Faldaprevir 120 mg 1日1回 + Deleobuvir 600 mg 1日3回にRBVを併用して16, 28, 40週間投与した3群(それぞれTID16W群, TID28W群, TID40W群), Faldaprevir 120 mg 1日1回 + Deleobuvir 600 mg 1日2回にRBVを併用して28週間投与した群(BID28W群), Faldaprevir 120 mg 1日1回 + Deleobuvir 600 mg 1日3回にRBVを併用せずに28週間投与した群(TID28W-NoRBV群)である(図3)。患者背景は表1に示すとおりである。

SVR12を示した患者の頻度(SVR12率)は, TID16W群で59%, TID28W群で59%, TID40W群で52%, BID28W群で69%, TID28W-NoRBV群で39%であった。SVR12率に関して, RBVを含むレジメン間では, 治療期間や投与量による有意差は認められなかったが, TID28W群はTID28W-NoRBV群と比較して有意に高い率を示した。(TID28W

群 59% vs TID28W-NoRBV群 39%,  $P = 0.03$ ) (図4)。

HCV-GTのサブタイプとして, GT-1aとGT-1bでの治療成績の比較では, SVR12率は, GT-1b患者では56~85%であったのに対しGT-1a患者では11~47%であり, GT-1b患者で高い治療効果を示した(図4)。

*IL28B*の遺伝子多型に関しても, SVR12率はCCの患者では58~84%であったのに対しCC以外の患者では33~64%で, 治療効果に差が認められた。

有害事象としては, 発疹, 光線過敏症, 悪心, 嘔吐, 下痢など比較的多く認められた。

SOUND-C2試験結果から, いくつかの問題点が考察される。

まずはIFN-Free治療でのRBVの意義である。本試験ではRBVなしの群でSVR12率は低く, 治療中のVirological breakthrough例, 治療後の再燃例が多くみられている。この所見は, RBVを用いていない他のIFN-Free治療でも報告されており<sup>3,4)</sup>, RBVがIFN-Free治療でのVirological breakthroughや再燃を抑えている可能性を示唆している。また, GT-1aとGT-1bでのSVR1率の違いに関して

表1 SOUND-C2 患者背景(文献2)

	TID 16w (n = 81)	TID 28w (n = 80)	TID 40w (n = 77)	BID 28w (n = 78)	TID 28w, No RBV (n = 46)
男性, n (%)	45 (56)	41 (51)	36 (47)	41 (53)	24 (52)
白人, n (%)	79 (98)	78 (98)	76 (99)	77 (99)	46 (100)
平均年齢, years (SD)	48.6 (11.3)	47.3 (11.2)	48.9 (10.7)	47.9 (11.1)	45.3 (13.0)
平均BMI, kg/m <sup>2</sup> (SD)	25.3 (4.1)	25.5 (4.1)	24.8 (3.8)	25.0 (3.6)	25.5 (3.8)
肝硬変症例, n (%)	9 (11)	7 (9)	5 (7)	13 (17)	3 (7)
<i>IL28B</i> <sup>a</sup> CC, n (%)	21 (26)	21 (26)	19 (25)	19 (24)	12 (26)
HCV GT-1a <sup>b</sup> , n (%)	34 (42)	32 (40)	34 (44)	30 (38)	18 (39)
HCV GT-1b <sup>b</sup> , n (%)	47 (58)	48 (60)	43 (56)	48 (62)	28 (61)
Baseline HCV RNA <sup>c</sup> , n (%) ≥800,000 IU/mL	70 (86)	66 (83)	67 (87)	66 (85)	36 (78)

<sup>a</sup>*IL28B* SNP rs 12979860

<sup>b</sup>血中HCV RNAはRoche COBAS<sup>®</sup> TaqMan HCV/HPS assay v2.0で測定した。  
HCV RNAの定量限界(Lower limit of quantification : LLOQ)は25 IU/mL,  
検出限界(Lower limit of detection : LOD)は15 IU/mLとした。

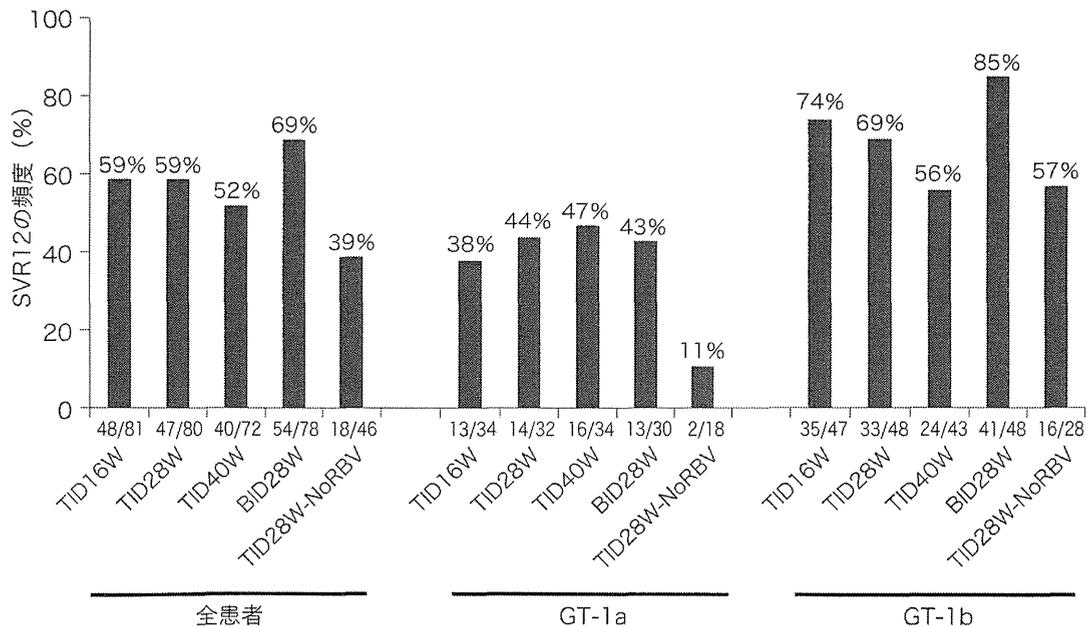


図4 SOUND-C2 治療成績(文献2から作成)

は, DeleobuvirがGT-1aに対する感受性が低いことに加えて<sup>5,6)</sup>, GT-1aがGT-1bに比較して薬剤耐性変異に対するGenetic Barrierが低いことが関与していると考えられる。他の

IFN-Free治療でも同様にGT-1aはGT-1bに比較して難治であるといくつか報告されている<sup>7,8)</sup>。*IL28B*の遺伝子多型に関して, CC以外の患者に比してCCの患者でSVR12率が高

1. 対象：未治療のC型慢性肝炎  
 GT-1a *IL28B* CC major (n=12)  
 GT-1b (n=20) 《肝硬変 4例含む》

2. 試験デザイン：

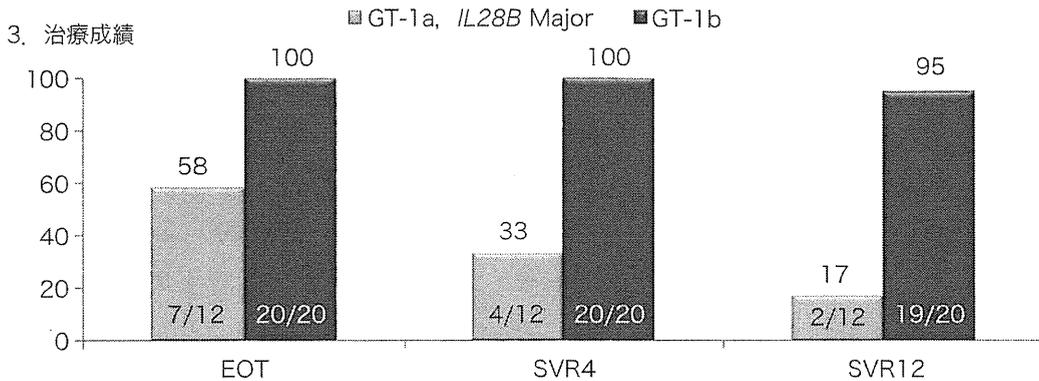
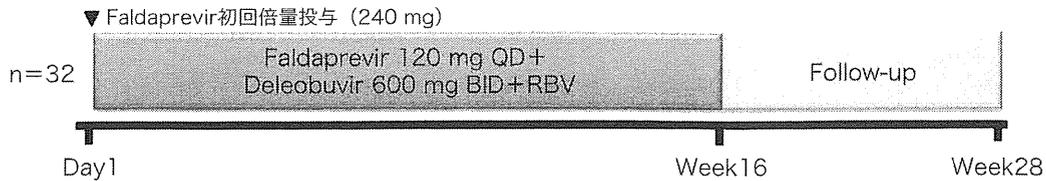


図5 SOUND-C3試験の概略(文献9より改変)

い理由としては、IFN-Free治療においても宿主の自然免疫が関与していることが示唆されるが、現時点で、その正確なメカニズムについては明らかにはなっていない。

## 5 SOUND-C3試験

SOUND-C2試験において、GT-1b患者を対象にFaldaprevirとDeleobuvir 1日2回投与とRBVの3剤を用いた28週間治療のレジメで85%のSVR12率が得られたこと、またGT-1a患者では全般的にSVR12率は低いものの、その中でも*IL28B*の遺伝子多型CCの患者のSVR12率は、GT-1b患者と近似していたことから、SOUND-C3試験においては、GT-1b患者20名(肝硬変患者4例を含む)とGT-1aでかつ遺伝子多型CCの患者(GT1a-CC)12名を対象に、Faldaprevir 120 mg 1日1回とDeleobuvir 600 mg 1日2回投与とRBVの3剤

併用治療が16週間行われた<sup>9)</sup>。

治療成績については、16週の治療終了時(EOT: End of Treatment), SVR4, SVR12の率は、GT1a-CC患者では、順に58% (7/12), 33% (4/12), 17% (2/12)であったのに対し、GT-1b患者では100% (20/20), 100% (20/20), 95% (19/20)であった。GT-1b患者でSVR12を示さなかった患者は、治療開始69日目に脱水のために治療を中断した患者であり、この1例を除いたGT-1b患者19例では100%のSVR12率であった(図5)。

これらのSOUND-C3試験の治療成績を参考として、未治療のGT-1b患者を対象とした、Faldaprevir/Deleobuvir/RBVの3剤併用療法のPhase III試験が海外ではすでに開始されている。



● 第1グループの投与開始4週後までの安全性データ、および薬物動態データをデータモニタリング委員会 (DMC)で検討し、次投与群への移行妥当性が確認された後に第2グループへの投与を開始する。

【投与開始8週までのHCV RNAの検出限界値 (LLOD) の推移 (8週間投与継続例)】



図6 国内第Ⅱ相試験の概略(文献10より改変)

## 6 日本人のデータ

わが国においても、未治療のGT-1b患者を対象としたPhaseⅡa試験が実施され、Faldaprevir / Deleobuvir / RBV 3剤併用療法に対する忍容性、安全性、薬物動態および抗ウイルス効果を、Faldaprevirの用量を変えた2つのグループ(80 mg 1日1回投与群 : n=12, 120 mg 1日1回投与群 : n=13)それぞれ8週間投与において比較検討された(図6)<sup>10)</sup>。

Faldaprevirの投与量の違いによるウイルス陰性化の速度への影響はみられず、いずれの投与量でも投与8週時点で90%以上の患者で血中HCV RNA量が検出感度以下(LLOQ : <10 IU/mL)を示した。主な有害事象は、悪心、嘔吐などの胃腸障害、発疹、そう痒症などの皮膚障害が認められ、大半は軽度であったが、Faldaprevir 120 mg投与群で高い傾向であっ

た。また、FaldaprevirおよびDeleobuvirの血中濃度は、同一投与量で白人よりも日本人の方が高く、日本人患者に対するFaldaprevir 80 mg投与と白人患者に対する120 mg投与で、いずれもほぼ同程度のトラフ血中濃度の推移がみられた。

これらの結果より、日本人においてもFaldaprevir/Deleobuvir/RBV 3剤併用療法の忍容性は良好であり、高い抗ウイルス効果が期待できることが確認された。また、有効性、安全性の観点から3剤併用療法においては、Faldaprevir 80 mgが日本人における用量設定としては妥当であると考えられた。わが国においても今後PhaseⅢ試験が実施される予定である。

## 7 おわりに

高齢者や肝発癌のリスクが高いC型慢性

肝炎患者が多いわが国では、Faldaprevir/Deleobuvir/RBV 3剤併用療法のように抗ウイルス効果が高く、かつ副作用が少ないIFN-Free治療に大きな期待が寄せられている。わが国でもさまざまなDAAsを組み合わせた治療法の開発が進められており、数年のうちに多くの治療の選択肢を得ることができるようになる。今後は、それぞれの治療法の特徴を十分に理解したうえで、どの治療法を選択することが個々の患者にとって最適であるかを検討し、治療を進めることが重要になると考えられる。

#### 文 献

- 1) Zeuzem S, Asselah T, Angus P et al : Efficacy of the protease inhibitor BI 201335, polymerase inhibitor BI 207127, and ribavirin in patients with chronic HCV infection. *Gastroenterology* 141 : 2047–2055, 2011
- 2) Zeuzem S, Soriano V, Asselah T et al : Faldaprevir and deleobuvir for HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 369 : 630–639, 2013
- 3) Zeuzem S, Buggisch P, Agarwal K et al : The protease inhibitor, GS-9256, and non-nucleoside polymerase inhibitor tegobuvir alone, with ribavirin, or pegylated interferon plus ribavirin in hepatitis C. *Hepatology* 55 : 749–758, 2012
- 4) Di Bisceglie AM, Nelson DR, Gane E et al : VX-222 with TVR alone or in combination with peg-interferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C : Zenith study interim results. *J Hepatol* 54 : S540–S540, 2011
- 5) Beaulieu PL, Anderson PC, Brochu C et al : Preclinical characterization of the hepatitis C virus NS5B polymerase non-nucleoside inhibitor BI 207127. *J Hepatol* 56 : S321–S321, 2012
- 6) Larrey DG, Benhamou Y, Lohse AW et al : BI 207127 is a potent HCV RNA polymerase inhibitor during 5 days monotherapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 50 : 267A–267A, 2009
- 7) Gane EJ, Pockros P, Zeuzem S et al : Interferon-free treatment with a combination of mericitabine and danoprevir/r with or without ribavirin in treatment-naive HCV genotype 1-infected patients. *J Hepatol* 56 : S555–S556, 2012
- 8) Sulkowski M, Rodriguez-Torres M, Lawitz E et al : High sustained virologic response rate in treatment-naive HCV genotype 1a and 1b patients treated for 12 weeks with an interferon-free all-oral quad regimen : interim results. *J Hepatol* 56 : S560–S560, 2012
- 9) Zeuzem S, Dufour JF, Buti M et al : Interferon-free treatment with faldaprevir, BI207127 and ribavirin in SOUND-C3 : 95% SVR12 in HCV-GT1b. *Hepatology Int* 7 S445. (Suppl 1) (Absno : 2842)
- 10) 八橋 弘, 田中 靖人, 小俣 政男 : C型慢性肝炎患者に対するFaldaprevir + BI207127 + Ribavirin経口療法による第2相試験. *肝臓* 54(suppl (2)) : A465, 2013

\* \* \*

# Soluble CD14 Levels Reflect Liver Inflammation in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis

Yuji Ogawa<sup>1</sup>\*, Kento Imajo<sup>1</sup>\*, Masato Yoneda<sup>1</sup>, Takaomi Kessoku<sup>1</sup>, Wataru Tomeno<sup>1</sup>, Yoshiyasu Shinohara<sup>1</sup>, Shingo Kato<sup>1</sup>, Hironori Mawatari<sup>1</sup>, Yuichi Nozaki<sup>1</sup>, Koji Fujita<sup>1</sup>, Hiroyuki Kirikoshi<sup>1</sup>, Shin Maeda<sup>1</sup>, Satoru Saito<sup>1</sup>, Koichiro Wada<sup>2</sup>, Atsushi Nakajima<sup>1\*</sup>

**1** Department of Gastroenterology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan, **2** Department of Pharmacology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Suita, Japan

## Abstract

**Background & Aims:** Liver inflammation is a risk factor for the progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, the diagnosis of liver inflammation is very difficult and invasive liver biopsy is still the only method to reliably detect liver inflammation. We previously reported that overexpression of CD14 in Kupffer cells may trigger the progression to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) via liver inflammation following hyper-reactivity to low-dose lipopolysaccharide. Therefore, the aim of this study was to investigate the relationship between soluble type of CD14 (sCD14) and histological features in patients with NAFLD.

**Methods:** Our cohort consisted of 113 patients with liver biopsy-confirmed NAFLD and 21 age-matched healthy controls. Serum sCD14 levels were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** Serum sCD14 levels were significantly associated with diagnosis of NASH and the area under the receiver operator characteristic curve (AUROC) to distinguish between not NASH and NASH was 0.802. Moreover, serum sCD14 levels were significantly associated with the disease activity based on NAFLD activity score and hepatic CD14 mRNA expression, which is correlated with membrane CD14 (mCD14) expression, in patients with NAFLD. In multiple regression analysis, the serum sCD14 levels were independently associated with liver inflammation. The AUROC to distinguish between mild and severe liver inflammation in patients with NAFLD was 0.752.

**Conclusions:** We found that serum sCD14 levels increased significantly with increasing liver inflammation grade in patients with NAFLD, reflecting increased hepatic CD14 expression. Serum sCD14 is a promising tool to predict the worsening of liver inflammation, and may offer a potential biomarker for evaluation of therapeutic effects in NAFLD.

**Citation:** Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, et al. (2013) Soluble CD14 Levels Reflect Liver Inflammation in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. PLoS ONE 8(6): e65211. doi:10.1371/journal.pone.0065211

**Editor:** Nikki Pui-yue Lee, The University of Hong Kong, Hong Kong

**Received:** November 13, 2012; **Accepted:** April 24, 2013; **Published:** June 7, 2013

**Copyright:** © 2013 Ogawa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Work in the authors' laboratory was supported by the program "Step A" from the Japan Science and Technology Agency (JST) and Kiban-B, Shingakujuturyouiki. In addition, the present work was supported in part by grants-in-aid from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: nakajima-ky@umin.ac.jp

\* These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a major cause of chronic liver injury in many countries [1,2]. A recent study showed that the risk of developing NAFLD is 4–11 times higher in patients with metabolic syndrome, compared with healthy individuals [3]. NAFLD ranges from benign simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), while NASH often progresses to severe fibrosis [4,5] and hepatocellular carcinoma [6–8]. In addition, the mechanisms involved in the development of NASH are not fully understood and the therapeutic options limited. Therefore, predicting the progression of simple steatosis to NASH and developing methods to facilitate the precise diagnosis of NASH are important targets for clinical research.

Inflammation is a central process in the pathogenesis of NASH. Previous reports have shown that chronic liver inflammation is an important contributing factor to the pathogenesis of NASH and the key predictor of histological progression [9–11]. Therefore, precise detection and evaluation of liver inflammation are important to help predict the progression of NASH. In fact, several clinical biomarkers associated with systemic inflammation, including serum high-sensitivity C-reactive protein (CRP) [12] and cytokines [13], have been proposed as potential markers of liver inflammation to aid NASH diagnosis. However, no clinical studies have confirmed the usefulness of these markers to date. Therefore, invasive liver biopsy is still the only method to reliably detect liver inflammation and reach a definite diagnosis of NASH. However, this procedure is invasive and is associated with a relatively high risk of complications [14], emphasizing the clinical importance of

identifying biomarkers for liver inflammation in patients with NAFLD.

We recently discovered that leptin-induced overexpression of CD14 in the liver is an important component of the pathogenesis of NASH [15]. We found that CD14 overexpression resulted in a hyper-responsiveness to low-dose lipopolysaccharide (LPS), an important step in the progression from simple steatosis to steatohepatitis, and was associated with liver inflammation and fibrosis [15]. These results suggest that measuring hepatic CD14 expression, which reflects its expression in Kupffer cells, may be useful to predict liver inflammation in NASH. However, invasive biopsies are still required to collect the tissue samples used to measure liver CD14 expression.

CD14 is a co-receptor that is detected in two forms: a glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein (mCD14) and a soluble serum protein (sCD14) lacking the anchor protein [16]. Additionally, several reports have shown that sCD14 is shed from the surface of mCD14-expressing cells [16–18], although the exact roles of sCD14 are still unknown. Therefore, we hypothesized that serum sCD14 levels, shed from mCD14, might be highly correlated with hepatic CD14 expression levels in NASH patients, and could predict the severity of NASH, particularly liver inflammation. If this hypothesis is correct, measuring serum sCD14 levels may be very useful to predict the progression of NASH and could become a routine test for the assessment in NAFLD patients for predicting NASH progression instead of invasive liver biopsy. Therefore, the purpose of this study was to investigate the clinical usefulness of measuring serum sCD14 levels as a biomarker for assessing the severity of NASH.

## Patients and Methods

### Subjects

The study population consisted of 113 patients with biopsy-confirmed NAFLD and 21 healthy control subjects, aged  $\geq 20$  years, who attended Yokohama City University between April 2007 and March 2012. We obtained written informed consent from all subjects before conducting examinations. The study was conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee at Yokohama City University. Subjects with a history of excessive alcohol consumption (weekly consumption  $>140$  g for men,  $>70$  g for women), other liver diseases, use of drugs associated with fatty liver, and clinically significant weight loss, for example, were excluded. Twenty-one healthy subjects with a mean age and sex ratio similar to those of the NAFLD group were also enrolled. Liver enzyme levels and ultrasound scans were normal for all of the healthy subjects. For the purpose of this study, subjects diagnosed with diabetes mellitus before the present admission and subjects with fasting plasma glucose  $>126$  mg/dl and/or serum HbA1c  $>6.1\%$  were defined as having diabetes mellitus. Subjects taking antidyslipidemic drugs and subjects with cholesterol  $>220$  mg/dl and/or triglyceride  $>150$  mg/dl were defined as having dyslipidemia. Subjects using antihypertensive drugs and subjects with resting blood pressure exceeding 130/85 mmHg on at least two occasions were defined as having hypertension.

### Clinical and Laboratory Evaluations

Body weight and height were measured with a calibrated scale after the subjects had removed their shoes and any heavy clothing. Venous blood samples were obtained after an overnight (12 h) fast and were used to measure serum glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), CRP, ferritin, and insulin. Serum insulin levels were measured using a radioimmuno-

noassay. The other parameters were measured using a conventional automated analyzer. Insulin resistance was calculated using the modified homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) equation:  $\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{plasma glucose } (\text{mg/dl}) / 405$ , as originally reported by Matthews et al [19].

### Anthropometry and Abdominal Fat Distribution

Abdominal fat distribution was determined by computed tomography (CT) with the subjects in a supine position, as previously described [20]. Subcutaneous fat area and intra-abdominal visceral fat area were measured at the level of the umbilicus using a standardized method based on CT values. A histogram representing the fat tissue was computed based on the mean attenuation  $\pm 2$  standard deviations (SDs).

### Measurement of Serum sCD14 Levels

Serum sCD14 levels were measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Abingdon, UK). The intra- and interassay coefficients of variation stated by the manufacturers were  $<7\%$  for all assays.

### Histological Assessment

We performed liver biopsies with an 18G needle biopsy kit using a standard protocol. Two specimens were obtained to provide a sufficient sample size for analysis and to reduce histological errors. Liver biopsy samples were excised and embedded in paraffin for histological analysis. The presence of collagen, as an index of lesion fibrosis, was examined in Masson's trichrome-stained preparations. Histological assessment of liver was performed by two pathologists according to criteria proposed by Sanyal and Brunt et al. [21–22]. Macrovesicular steatosis affecting at least 5% of the hepatocytes was observed in all the cases of NAFLD, and the patients were classified as not having steatohepatitis (not NASH) or having steatohepatitis (NASH). In addition to steatosis, the minimum criteria for the diagnosis of steatohepatitis include the presence of lobular inflammation, ballooning of cells and perisinusoidal/pericellular fibrosis in zone 3 of the hepatic acini. Steatosis was graded as  $<5\%$  (grade 0), 5–33% (grade 1), 33–66% (grade 2), and  $>66\%$  (grade 3). Lobular inflammation was graded according to the number of inflammatory foci per field of view at a magnification of 200 $\times$ , as follows: no foci = 0,  $<2$  foci per field = 1, 2–4 foci per field = 2, and  $>4$  foci per field = 3. Hepatocellular ballooning was graded as none (grade 0), few ballooning cells (grade 1), and many balloon cells (grade 2). The pathologists also performed NAFLD activity scoring based on Kleiner et al [23] to evaluate disease activity, but the actual diagnosis was not based on NAFLD activity score (NAS) [21]. The NAS was calculated as the unweighted sum of the scores for steatosis, lobular inflammation, and hepatocellular ballooning based on the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network methodology. The severity of fibrosis was scored according to the method of Brunt [22]. Subjects with NASH-associated cirrhosis were defined according to a previously proposed clinicopathological classification [24].

### RNA Isolation and Real-Time PCR Analysis

Total RNA was extracted from liver tissue samples from patients with NAFLD ( $n = 70$ ) using the RNeasy mini kit (QIAGEN, Tokyo, Japan). The mRNA expression levels of human CD14 and  $\beta$ -actin were determined in liver tissue by fluorescence-based RT-PCR on an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Life Technologies, Carlsbad, CA).

## Cell Culture

The murine monocyte/macrophage cell line RAW264.7 was obtained from ATCC (Rockville, MD). Cells were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (ASAHI TECHNO GLASS Co., Tokyo, Japan), and supplemented with 100 units/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin plus 10% fetal bovine serum. After incubation, the medium was treated with LPS (10 ng/mL) in PBS for 2 or 4 h. PBS supernatants were recovered, treated with protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich), and centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min, following the analysis of sCD14 in the culture medium using by a Western immunoblot analysis and a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Proteins were incubated with anti-mouse CD14 antibodies (BD Pharmingen), and HRP-conjugated secondary antibody (Cell Signaling Technology).

## Statistical Analysis

Continuous variables are summarized as means ± standard deviation, while categorical variables are summarized as percentages. Spearman's correlation coefficient was used to determine the correlations between serum sCD14 levels and the factors of interest. The *t*-test was used for univariate comparisons between groups of subjects. Because many of the variables were not normally distributed, we used the Kruskal–Wallis test for comparisons of more than two independent groups. We assessed the diagnostic performance of serum sCD14 levels by analyzing the receiver operating characteristic (ROC) curves. The ROC curve is a plot of sensitivity versus 1– specificity for all possible cutoff values. The most commonly used index of accuracy is the area under the ROC curve (AUROC), with values close to 1.0 indicating a high diagnostic accuracy. The accuracy of serum sCD14 levels for discriminating between mild and severe inflammation was determined by calculating the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV). Multivariate analysis was performed using logistic regression analysis. In all analyses, values of *P* < 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS software version 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

## Results

### Patient Characteristics

The clinical and biochemical characteristics of the healthy controls (*n* = 21), and patients without NASH (*n* = 48), and NASH (*n* = 65) are shown in Table 1. The histological findings of the liver biopsy specimens taken from the patients with NAFLD are shown in the lower part of Table 1. The inter-observer agreement between the two pathologists for liver fibrosis stage was 90.2%.

### Serum sCD14 Levels

We measured serum sCD14 levels in the healthy controls and in the two subgroups of patients with NAFLD. We found no marked differences in the serum CD14 levels between the healthy controls and patients without NASH (Fig. 1A). However, the serum sCD14 level was markedly elevated in patients with NASH compared with that in patients without NASH (Fig. 1A). The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve for distinguishing between not NASH and NASH using serum sCD14 level was 0.796 (Fig. 1B). Using a cutoff level of greater than 27.3 ng/ml for serum sCD14 level yielded sensitivity and specificity values of 81.5% and 72.5%, respectively. The positive and negative predictive values for the serum sCD14 level of 27.3 ng/ml were 73.6% and 80.6%, respectively.

The correlations between serum sCD14 levels and the clinical characteristics of patients with NAFLD are shown in Table 2. Serum sCD14 levels were significantly correlated with NAS (Spearman's *r* = 0.354, *P* = 0.004) and with individual NAS components, including lobular inflammation, ballooning, and fibrosis. The strongest positive correlation was observed between the serum sCD14 level and the grade of lobular inflammation (*r* = 0.498, *P* < 0.001) (Table 2 and Fig. 1C). These results indicate that serum sCD14 levels closely reflect the disease activity of NAFLD, especially the grade of liver inflammation.

Next, we investigated the relationship between serum sCD14 levels and hepatic CD14 mRNA expression using liver biopsies from patients with NAFLD. As shown in Fig. 1D, the serum sCD14 levels were significantly correlated with the hepatic CD14 mRNA expression levels in patients with NAFLD (*r* = 0.552, *P* < 0.001). These results indicate that serum sCD14 levels in patients with NAFLD closely reflect the hepatic CD14 expression levels.

### Multiple Regression Analysis to Predict Lobular Inflammation in Patients with NAFLD

Next, we investigated the correlation between serum sCD14 levels and other clinical factors that may be involved in lobular inflammation in NAFLD using multiple regression analysis. For this analysis, we divided patients with NAFLD into two categories, mild inflammation (grade 0–1) and severe inflammation (grade 2–3), according to the criteria. The clinical and biochemical characteristics of both groups of patients are shown in Table 3. We performed multiple logistic regression analysis using age, BMI, ALT, CRP, and sCD14, which were significantly higher in patients with severe liver inflammation compared with patients with mild inflammation in univariate analyses. We also included sex in the multivariate analysis because the sex ratio was also significantly different between the two groups. Notably, only the serum sCD14 level was independently associated with grade of liver inflammation in the multiple regression analysis (Table 4).

### Receiver Operator Characteristic Curve for liver inflammation

To discriminate between severe (grade 2–3) and mild (grade 0–1) liver inflammation in NAFLD, we plotted ROC curves and calculated the AUROC (Fig. 2). The resulting AUROC was 0.752. Based on the ROC curve, the optimal cutoff level for severe liver inflammation was 29.5 ng/dl. The sensitivity, specificity, PPV, and NPV were 78.2, 72.4, 79.6, and 62.9%, respectively.

### LPS-induced sCD14 *in vitro*

Finally, to elucidate whether LPS can directly affect secretion of sCD14 from macrophages, we investigated sCD14 levels in the culture medium of RAW264.7 cells, the murine monocyte/macrophage cell line, incubated with LPS using by Western immunoblot analysis and a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. LPS treatment for RAW 264.7 cells significantly increased sCD14 in the cell culture medium (Fig. 3). These results support the observation that LPS increases secretion of sCD14 from macrophages including Kupffer cells.

## Discussion

In the present study, we showed that serum sCD14 levels were significantly associated with diagnosis of NASH. Moreover, the increased sCD14 levels in NASH patients were highly correlated with increased hepatic CD14 expression and liver inflammation, even after adjusting for age, sex, presence of diabetes, dyslipide-