

原 著

(東女医大誌 第67巻 第6号)
〔頁 414~419 平成9年6月〕

C型慢性肝炎における肝組織内HCV-RNA量と インターフェロン治療効果について

東京女子医科大学 第二病院 内科II（指導：森 治樹教授）

*（株）エスアールエル遺伝子・染色体解析センター

ナカジマ	ヒロコ	トミマツ	マサヒコ	タマイ	ノリオ
中島 博子	・富松 昌彦	・玉井 紀男			
イガ	ダイジ	ロウ	エンドウ	ヒトシ	タカハシ
伊賀 大二郎	・遠藤 仁	・高橋 春樹			
オカノ	アキラ	モリ	ハルキ	ヒサトミ	ヒサシ
岡野 晃	・森 治樹	・久富 寿			

(受付 平成9年1月23日)

Relation between HCV-RNA Level in Liver Tissue and the Response to Interferon Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C

Hiroko NAKAJIMA, Masahiko TOMIMATSU, Norio TAMAI, Daijiro IGA,
Hitoshi ENDO, Haruki TAKAHASHI, Akira OKANO,
Haruki MORI and Hisashi HISATOMI*

Department of Medicine II (Director: Prof. Haruki MORI),

Tokyo Women's Medical College Daini Hospital

*Center for Molecular Biology and Cytogenetics, SRL, Inc.

Liver tissue and serum samples were obtained from 23 patients with chronic hepatitis C, and HCV-RNA levels of those samples were quantitated using RT-competitive PCR assay. We investigated the correlations between the hepatic HCV-RNA level, HCV genotype, and the effects of interferon (IFN) therapy.

Complete responders (CR), in whom HCV-RNA was cleared from serum more than six months after the end of IFN treatment, numbered 11 cases (47.8%). Non responders (NR), in whom serum HCV-RNA was detected after treatment numbered 12 cases (52.2%).

Before IFN treatment, there was a strong correlation between hepatic and serum HCV-RNA levels ($r=0.72$, $p<0.0001$). The HCV-RNA level in liver tissue was significantly higher, i.e., about 10^3 times, than it was in serum. HCV genotypes II and IV showed higher HCV-RNA levels than genotype III in both liver tissue and serum. HCV-RNA levels in liver tissue tended to be lower in CR than in NR. These observations suggest that the effect of IFN can be adequately predicted by looking at only HCV-RNA level and genotype in serum.

緒 言

C型慢性肝炎に対するinterferon(IFN)の有用性は、1986年、Hoofnagleら¹⁾により最初に報告され、それ以来多くの報告がなされてきた。そして、IFN治療終了時の血清中HCV-RNAは60~80%

の割合で陰性化するが、治療終了6カ月後にはその約半数にHCV-RNAが再出現することが知られている^{2)~4)}。これらのことより、血清中のHCVの消失は必ずしも肝組織内でのHCVの消失を意味するものではないと考えられる。

今回我々は、肝組織内および血清中の HCV-RNA 量を測定し、それらと genotype との関係、IFN の治療効果について検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

当科にて IFN 療法を施行した C 型慢性肝炎 23 例 (chronic persistent hepatitis: CPH 3 例, chronic active hepatitis 2A: CAH2A 13 例, CAH2B 7 例) を対象とした。男性 13 例、女性 10 例、年齢は 23 から 63 歳までで平均年齢は 42.3 歳であった (表 1)。

2. 方法

IFN 治療は、natural IFN α (HLBI 6MU/day: 2 例, BALL-1 10MU/day: 2 例) 4 例、 α -2a (9MU/day) 10 例、 α -2b (10MU/day) 3 例、 β (6MU/day) 6 例において施行した。 α は最初

2 週間連続筋肉注射し、その後は週 3 回を 22 週間投与した。一方、 β は静脈注射で 6 週間連続投与した。

血清中の HCV-RNA 量は全例治療開始前、終了時および終了 6 カ月後に測定した。肝組織中 HCV-RNA 量は対象となった 23 例中 15 例において治療前のみ測定した。他の 8 例においては治療前後に測定し、治療後の肝生検は治療終了時より 0.5 カ月から 3 カ月の間に施行した (表 2)。そして、治療開始前の肝組織内および血清中の HCV-RNA 量を比較し、それらと HCV genotype との関係、および肝組織内 HCV-RNA 量と IFN 療法の効果との関係について検討した。

1) 血清 HCV-RNA 量の測定 (competitive RT-PCR 法)

血清 HCV-RNA 量の測定は患者血清より acid

表 1 背景因子と IFN 投与前の肝組織・血清 HCV-RNA 量(log)

	症例	性	年齢 (歳)	genotype	組織像	肝組織内 (copies/50mg)	血清中 (copies/50μl)	肝組織/血清
著効例	1	M	45	III	CAH2B	4.2	2.0	100
	2	M	40	IV	CAH2A	6.7	5.5	10
	3*	F	47	II	CAH2B	4.2	4.5	1/50
	4	M	37	IV	CAH2A	6.7	6.0	5
	5	M	53	III	CAH2B	6.2	4.0	100
	6*	M	45	検出不能	CAH2A	—	2.0>	
	n	M	30	判定不能	CAH2A	7.2	5.5	50
		M	57	II	CAH2A	3.7	4.0	1/50
	11	F	30	III	CPH	6.7	4.5	100
	10	F	50	III	CAH2B	7.2	4.0	1,000
	11	F	62	IV	CAH2A	6.2	4.0	100
平均			45.1			5.4	3.7	133
無効例	12	M	28	II	CAH2A	6.7	4.5	100
	13	M	24	II	CPH	7.2	5.5	50
	14	F	49	IV	CAH2A	7.7	4.0	5,000
	15	M	40	IV	CAH2A	8.2	4.5	5,000
	16	F	39	II	CAH2A	6.7	4.5	100
	17	F	55	II	CAH2B	7.7	5.5	100
	n	F	38	III	CAH2B	4.7	2.5	100
		M	63	II	CAH2A	7.7	5.5	100
	12	F	28	II	CAH2B	6.2	4.5	50
	21	F	31	II	CPH	6.2	2.0	10,000
	22	M	60	II	CAH2A	7.7	6.0	50
	23	M	23	II	CAH2A	8.7	5.0	5,000
平均			39.8			7.1	4.5	2,138
平均			42.3			6.3	4.3	1,179

*肝組織内 HCV-RNA 量が血清中より低値であった例。

表2 IFN 投与前後に肝生検を行った症例 (n=8)

症例	genotype	肝組織内 HCV-RNA 量 投与前 投与後 (copies/50mg)		血清中 HCV-RNA 量 投与前 投与後 (copies/50μl)		組織像 の変化	肝組織の 採取時期 IFN 後 (M)
1	III	4.2	2.7	2.0	—	改善	2.0
2	IV	6.7	—	5.5	—	改善	2.0
6	検出不能	—	—	2.0>	—	改善	2.0
8	II	3.7	—	4.0	—	改善	1.5
9	III	6.7	—	4.5	—	不变	0.5
10	III	7.2	4.2	4.0	—	改善	3.0
11	IV	6.2	4.7	4.0	—	改善	1.5
22	II	7.7	8.2	6.0	5.5	不变	1.5

guanidium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC 法)⁵⁾にて RNA を抽出し、この RNA 溶解液に YCA primer (5'-ACTCGCAAGCACC-CTATCAG-3') を含んだ cDNA 合成溶液と competitor RNA (Bluescript®に31bp の失欠部位を設定した5' non coding region をクローニングし T7 DNA polymerase によって合成) を添加し、55°C60分で cDNA 合成を行った。なお、competitor RNA はその OD 値から $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ および 10^7 copies/tube に設定した。合成した cDNA に YCA primer と YCS 13 primer (5'-GAGGAACCTACTGTCTTCACG-3') を含んだ first-PCR 溶液を添加し35サイクルの first-PCR 反応を行った。

次に YCA primer と YCS 2 primer (5'-GAGC-CATAGTGGTCTGCGGA-3') を含んだ second-PCR 溶液にそれぞれの first-PCR 産物を添加して25サイクルの second-PCR 反応を行った。PCR 増幅産物を 3 % アガロースゲル電気泳動に供し、ethidium bromide 染色後 UV トランスイルミネーターにて178bp に HCV-RNA 由来のバンドを、また147bp に competitor RNA 由来のバンドを確認した。

2) 肝組織 HCV-RNA 量の測定

Vim-Silverman 鍉で採取した肝生検材料を -30°C に凍結保存し、10mg を AGPC 法に基づき Isogen(日本ジーン) 中で homogenize した。chloroform 添加液12,000rpm で15分遠心し ethanol 沈殿にて RNA を回収し、RNA 溶解液に溶解した。以後は血清 HCV-RNA と同様に cDNA 合成

と competitive RT-PCR を行った。

3) HCV genotype の測定

岡本らの方法⁶⁾により分類した。

なお、効果判定は IFN 終了 6 カ月以上血清 HCV-RNA の陰性化が持続するものを著効とし、HCV-RNA が陰性化しないものや再陽性化する例は無効とした。

3. 統計処理

相関関係の検定には、Pearson の相関係数を求めて危険率0.05未満を有意とした。一方、HCV-RNA 量の平均値は対数変換して求め、2群間の比較には Mann-Whitney 検定を行い危険率0.05未満を有意とした。

結果

対象となった23例のうち、著効は11例、無効は12例であった(表1)。

IFN 開始前の HCV-RNA 量を見ると肝組織内では $10^{3.7} \sim 10^{8.7}$ copies/50mg (平均 $10^{6.3}$ copies/50mg、症例 6 は検出不能)、血清中では $10^{2.0} \sim 10^{6.0}$ copies/50μl (平均 $10^{4.3}$ copies/50μl) であった。著効例の3例(症例 3, 6, 8)は肝組織内 HCV-RNA 量が血清中より低値であったが、他の20例は肝組織内 HCV-RNA 量の方がより多い値を示した。HCV-RNA 量の肝組織/血清の値は 5~10,000 (平均約1,000倍) であり、両者の間に強い相関 ($r=0.72$, $p<0.0001$) を認めた(図1)。

HCV genotype は、II型11例(47.8%), III型5例(21.7%), IV型5例(21.7%), 判定不能1例(4.3%)で、1例はウイルス量が少なく検出され

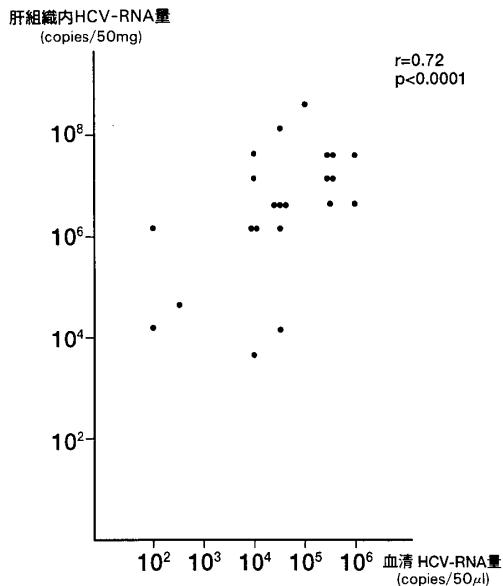


図1 肝組織内HCV-RNA量と血清中HCV-RNA量の比較

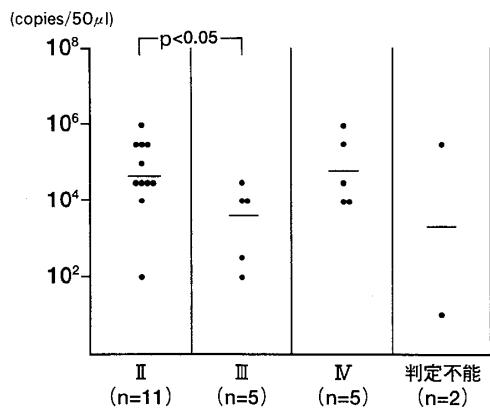


図2 血清中HCV-RNA量とgenotype

なかつた。

それぞれの血清中HCV-RNA量の平均は、II型 $10^{4.7}$ ($10^{2.0} \sim 10^{6.0}$)、III型 $10^{3.4}$ ($10^{2.0} \sim 10^{4.5}$)、IV型 $10^{4.8}$ ($10^{4.0} \sim 10^{6.0}$) copies/50μlで、II型、IV型に多くIII型に少ない傾向がみられ、特にII型、III型の間には有意差を認めた(図2)。

一方、肝組織内HCV-RNA量はII型 $10^{6.6}$ ($10^{3.7} \sim 10^{8.7}$)、III型 $10^{5.8}$ ($10^{4.2} \sim 10^{7.2}$)、IV型 $10^{7.1}$ ($10^{6.2} \sim 10^{8.2}$) copies/50mgで、血清中と同様にII型、IV型に多くIII型に少ない傾向がみられた(図3)。

IFNの治療効果と肝組織内HCV-RNA量との関係をみると、著効例の平均ウイルス量は $10^{5.4}$ copies/50mgであった。無効例ではその約100倍

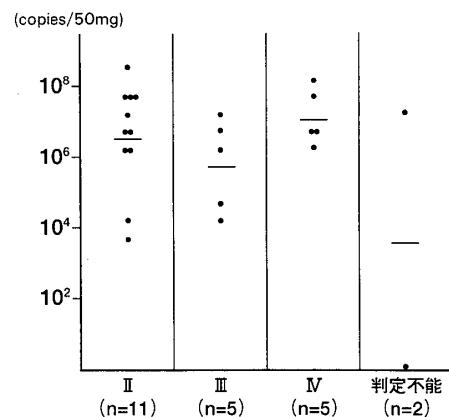


図3 肝組織内HCV-RNA量とgenotype

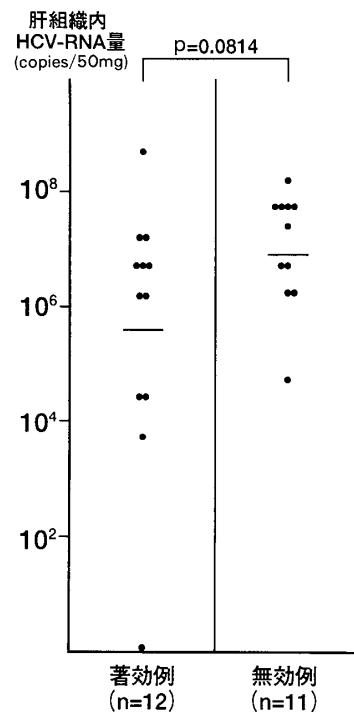


図4 肝組織内HCV-RNA量とIFN治療効果

の $10^{7.1}$ copies/50mgとなり、無効例に多い傾向が認められた($p=0.0814$)(図4)。

genotype別にみると、II型、IV型では肝組織内HCV-RNA量が少ないものに著効例が多いが、III型では、肝組織内HCV-RNA量が多いものにも著効例が見られた(図5)。

肝組織内HCV-RNA量が血清中HCV-RNA量を下回っていた2例に関しては、いずれもII型で肝組織内HCV-RNA量は $10^{3.7}$ 、 $10^{4.2}$ copies/50mgでIFN治療は著効を呈した。

IFN治療前後で肝組織内HCV-RNA量を測定

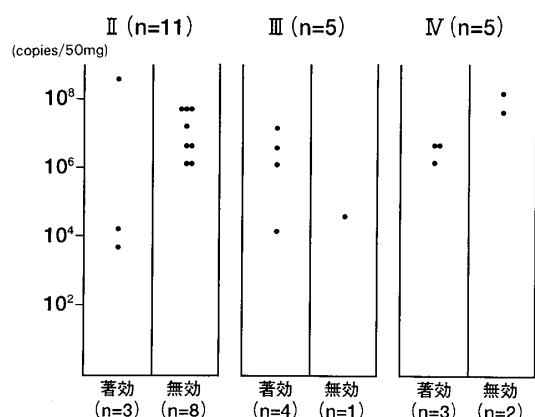


図5 HCV-RNA(肝組織内RNA量, genotype)とIFN治療効果

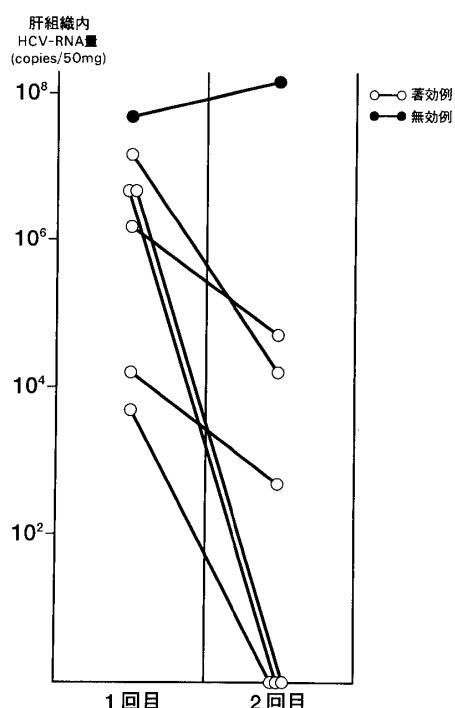


図6 IFN前後の肝組織内HCV-RNA量の変化

した8例のうち、HCV-RNA量が検出されなかつた1例（症例6）を除く他の7例につき、治療前後のHCV-RNA量の変化を図6に示した。8例中7例が著効を呈し、そのうちの4例（57.1%）が肝組織内HCV-RNAが陰性化した（表2）。他の3例は著効を呈し、血清中HCV-RNA量は減っているものの肝組織内にHCV-RNAの残存が認められた（症例1：10^{2.7}、症例10：10^{4.2}、症例11：10^{4.7}copies/50mg）。しかしながらこの3例は、その後治療終了19カ月にわたり血清中には

HCV-RNAの再陽性化は認められていない。

考 察

血清中のHCV-RNA量は、IFNの治療効果に影響を及ぼす重要な要因の一つとされており⁷⁾、さらにそれが持続的に陰性化することは、宿主からのHCVの消失を意味すると考えられている。しかし、肝組織内のHCV-RNA量や、それとHCV genotype、IFN治療との関係に関して検討した報告は少ない。Nakagawaら⁸⁾や、Yatsuhashiら⁹⁾は肝組織内の量は血清中の量に比べ10²～10⁴倍多く、よく相関すると報告している。今回、我々の検討でも、肝組織内HCV-RNA量は血清中HCV-RNA量の約10³倍で、それらは強い相関関係にあることが認められた。さらにIFN治療効果に関しても、血清中HCV-RNA量と同様に、著効例では肝組織内HCV-RNA量は少なく、無効例では多い傾向が見られた。genotype別では、肝組織内HCV-RNA量はII型、IV型に多くIII型に少ない傾向がみられ、これも血清中HCV-RNA量と同様の傾向が認められた。

以上のことより、IFNの治療効果の予測は肝組織内のHCV-RNA量を測定するまでもなく、従来より言われているように、血清中のHCV-RNA量とgenotypeで十分に予測できると考えられる。

一方IFN治療前後で肝組織内HCV-RNA量を測定した著効例7例のうち3例は量は減少しているものの肝組織内にHCVが残存していた。久富らもIFN著効例で同様な症例を報告¹⁰⁾しているが、肝組織内のマイナス鎖は検出されず、増殖が認められないため、近い将来消失することが予測される。しかしHCV-RNAが長期に肝組織内に存在する場合はIFN著効例で肝細胞癌が発症した症例も報告¹¹⁾されており、著効例での発癌の原因となり得ると思われ、今後の重要な検討課題である。

結 論

治療前の肝組織内HCV-RNA量は血清中の約1,000倍のHCV-RNAが存在し、両者の間には強い相関関係が認められた。genotype別に見ても血清と同じ傾向が見られ、IFN治療に関しても著効

例の方が無効例より肝組織内 HCV-RNA 量が低い傾向があった。

文 献

- 1) Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB et al: Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant of human alpha interferon. N Engl J Med 315 : 1575-1578, 1986
- 2) 萩原秀紀, 林 紀夫, 三田英治ほか: Interferon 治療時の血中 C 型肝炎ウイルス RNA の検討. 日消病会誌 88 : 1420-1425, 1991
- 3) Chayama K, Saito S, Arase Y et al: Effect of interferon administration on serum hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 13 : 1040-1043, 1991
- 4) 赤羽賢浩, 岡田俊一, 宮崎吉規ほか: C 型肝炎に対する interferon の短期投与の抗ウイルス効果. 肝臓 32 : 243-249, 1991
- 5) Chomezynski P, Sacchi N: Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162 : 156-159, 1987
- 6) Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S et al: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: Application to clinical surveys and tracing infectious sources. J Gen Virol 73 : 673-679, 1992
- 7) 加藤直也, 横須賀収, 小俣政男ほか: Competitive RT-PCR(CRT-PCR)法による C 型肝炎ウイルス量の測定とインターフェロン治療効果. 肝臓 32 : 750-751, 1991
- 8) Nakagawa H, Shimomura H, Hasui T et al: Quantitative detection of hepatitis C virus genome in liver tissue and circulation by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. Dig Dis Sci 39 : 225-233, 1994
- 9) Yatsushashi H, Inoue O, Koga M et al: Correlation between serum and liver tissue HCV-RNA levels in patients with chronic hepatitis C. Int Hepatol Commun 3 : 35-40, 1995
- 10) 久富 寿, 鶴園史子, 引地一昌ほか: 肝組織内 HCV-RNA プラス鎖マイナス鎖の検出—マイナス鎖 HCV-RNA のセルフアニーリングについて. 肝臓 36 : 511-516, 1995
- 11) 池田美和, 木野山真吾, 新山豪一ほか: IFN 療法に著効を示したにもかかわらず, 約 1 年 6 カ月後に細小肝癌が発見された C 型慢性肝炎の 1 例. 肝臓 36 : 485-490, 1995