

原 著

C型慢性肝炎のインターフェロン治療後の線維化の  
改善に関する検討

東京女子医科大学 附属第二病院内科 (指導: 大川真一郎教授)

\*同 病院病理科

タカハシ ハルキ トミマツ マサヒコ オオカワシンイチロウ アイバ モトヒコ  
高橋 春樹・富松 昌彦・大川真一郎・相羽 元彦\*

(受付 平成9年11月20日)

Evaluation of Improvement of Hepatic Fibrosis After Interferon  
Therapy for Chronic Hepatitis Type CHaruki TAKAHASHI, Masahiko TOMIMATSU, Shin-ichiro OHKAWA and Motohiko AIBA  
Department of Medicine and \*Surgical Pathology,  
Tokyo Women's Medical College Daini Hospital

We studied the change of hepatic fibrosis after the cessation of interferon (IFN) therapy for chronic hepatitis type C in 46 patients. We stained biopsy specimens by Masson trichrome staining and immunohistochemical staining for type I・III・IV collagens, and classified the cases into 4 stages (F<sub>0</sub>~F<sub>3</sub>). The effect of IFN was correlated with quantity and genotype of HCV but not with a pathological stage. Hepatic fibrosis improved more significantly in responders than in non-responders in terms of both pathology and fibrogenesis serum markers. We concluded that IFN works indirectly on improvement of fibrosis by way of HCV clearance. Type I collagen was observed only in Glisson sheath.

In F<sub>1</sub>, but was additionally observed in the expanded fibrotic areas in F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub>. In improved cases, type III and type IV collagens appeared as pericellular fibrosis and thin septal fibrosis, with type I collagen was also present in the same area. These histological features may show the process of hepatic collagen degeneration.

## 緒 言

C型慢性肝炎(CH)に対してインターフェロン(IFN)治療が現在広く施行されている。その目的はC型肝炎ウイルス(HCV)の消失であるが、有効例において線維化の改善する症例が認められる。これまで、type III プロコラーゲンのアミノターミナルペプチド(PIIIP)やtype IV コラーゲン7S (IV7S)などの血清マーカーを用いて線維化の改善を証明した報告<sup>1)~4)</sup>は多数認められる。また、Knodellら<sup>5)</sup>による histology activity index (HAI) scoring system を用いて、炎症所見と線維化を評価したものはあるが、線維化に絞って検討し

た報告は少ない。

今回我々はIFN治療前後に肝生検を施行したCH 46例について、その線維化の動向を、病理組織像・免疫組織学的所見と血清線維化マーカー(PIIIP・IV7S)で比較検討した。

## 対象および方法

## 1. 対象

対象は、1992年1月より1995年2月の間にIFN療法を施行したCH症例46例(男36例・女10例)で、治療前後でそれぞれ患者の同意を得て肝生検を施行した。年齢は、21歳から62歳で平均は46.2±9.8歳(男45.1±10.3歳・女50.2±5.9歳)である。

使用した IFN は, natural  $\alpha$  が 9 例, 同  $\alpha$ -2a が 20 例, 同  $\alpha$ -2b が 9 例, 同  $\beta$  が 8 例である。

投与方法は, natural  $\alpha$  は 2 週連日ついで 22 週・週 3 回筋肉内投与とし, 同  $\beta$  は 6 週連日静脈内投与を原則とした。血清 HCV-RNA は, competitive RT-PCR 法で, IFN 投与前と終了 6 カ月後の 2 回測定し効果判定を行った。その際, 治療終了後 6 カ月の時点で HCV-RNA が陰性化している症例をウイルス駆除群 (駆除群) とし, トランスアミナーゼの正常化の有無にかかわらず, HCV-RNA が陰性化しないか, または再陽性化する例をウイルス残存群 (残存群) とした。

患者の年齢・性差・ウイルス量・HCV genotype・ALT の正常化については, 駆除群・残存群別に表 1, 2 に示した。

## 2. 方法

血清の HCV-RNA 量は, 5'-non-coding region を primer とした competitive RT-PCR 法で測定し, HCV genotype は岡本ら<sup>6)</sup>の方法により分類した。

肝生検は, IFN 療法前後に 14G の Silvermann 針でエコーガイド下に施行した。治療後の生検の時期は終了時より 1~16 カ月である。採取した標本は, ホルマリン固定しパラフィン包埋した後, Masson trichrome 染色を施行した。これらの線維化の程度を, 新犬山シンポジウムの分類<sup>7)</sup>に準じて, F<sub>0</sub>~F<sub>3</sub> の 4 段階に分類した (F<sub>0</sub>; 線維化なし, F<sub>1</sub>; 門脈域の線維性拡大, F<sub>2</sub>; bridging

fibrosis, F<sub>3</sub>; 小葉の歪みを伴う bridging fibrosis)。

コラーゲン線維に対する免疫染色は, グコジヤパン社の LSAB キットによる labelled strept-avidin biotin 法を用いた。厚さ 4 $\mu$ m に薄切した組織切片を脱パラフィンした後, 0.01M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 中に浸し, 電子レンジ内で, 10 分の放置を挟み 3 分間で 3 回, マイクロウエイブ処理した。続いて, 内因性ペルオキシダーゼ活性を 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 分間で除去し, blocking protein 液 5 分間で処理した後, 20 倍に希釈したモノクローナル抗体である抗ヒトコラーゲン I・III・IV 抗体 (一次抗体) と 4°C で 24 時間反応させた。0.1M のリン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗浄後, biotin, 標識二次抗体, peroxidase streptavidin (酵素溶液) と各 10 分間反応させた。発色剤は, 3,3'-diaminobenzidine (DAB; 発色基質), 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (基質試薬) を使用し, hematoxylin-eosin で後染色した。

血清線維化マーカーは 40 例 (駆除群 21 例・残存群 19 例) で測定し, その線維化の程度による内訳は, F<sub>1</sub>: 29 例, F<sub>2</sub>: 9 例, F<sub>3</sub>: 2 例である。各症例とも IFN 投与前と投与終了後肝生検時の 2 回採血し, PIIP と IV7S を各々 RIA 固相法, RIA2 抗体法を用いて測定した。

## 3. 統計学的処理

統計学的処理は, 線維化, 改善度に関しては  $\chi^2$  検定を, また 2 群間の比較には Mann-Whitney test を, 関連ある 2 群間の値の検定には Wilcoxon signed rank test を用いて, いずれも危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

## 結 果

ウイルス駆除群と残存群とを比較すると, ウイルス量が 10<sup>5</sup> copies/50 $\mu$ l 未満の約 60% は駆除群に含まれるが, 10<sup>5</sup> copies/50 $\mu$ l 以上の 80% は残存群に含まれ, 有意差が認められた (p<0.01) (表 2)。

genotype では, 有意差はないが, II 型は残存群が多く III 型では駆除群が多かった (p=0.26) (表 3)。

病理所見は, 両群とも CAH2A の割合が高いが, 両群間での有意差はなかった (p=1.60) (表 4)。

表 1 対象の背景因子 (n=46)

	駆除群	残存群	p
症例数 (n)	22	24	
男女比	19:3	17:7	0.20
年齢 (歳)	46.0 $\pm$ 11.7	46.3 $\pm$ 7.8	
ALT 正常化率 (%)	17 (77)	1 (4)	<0.01

表 2 血清中ウイルス量と IFN 治療効果 (n=46)

HCV-RNA (PCR 法) (copy/50 $\mu$ l)	n	駆除群	残存群	(%)
10 <sup>5</sup> 未満	30	19 (63)	11 (37)	
10 <sup>5</sup> 以上	16	3 (19)	13 (81)	

p<0.01

表3 HCV genotype(n=46)

Genotype	n	駆除群	残存群	(%)
II	19	7(41)	12(59)	
III	12	8(67)	4(33)	
IV	9	4(44)	5(56)	
不明	6	3(50)	3(50)	

表4 IFN 治療前の病理所見(ヨーロッパ分類)(n=46)

組織型	駆除群 n=22	残存群 n=24	(%)
CPH	3(14)	3(13)	
CAH2A	12(54)	17(70)	
CAH2B	7(32)	4(17)	

CPH: chronic persistant hepatitis, CAH: chronic active hepatitis, p=1.60.

Masson 染色による検討では、治療前の両群間で線維化に関しては、有意差は認めなかった(p=0.99) (表5)。

治療後に線維化の改善を認めるのは、駆除群で22例中12例(54%)で、残存群に比し有意に高率であった(p<0.01) (表6)。ただし、残存群に3例(12%)改善を認め、駆除群でも6例(27%)

表5 IFN 治療前の線維化 stage(n=46)

線維化 stage	駆除群 n=22	残存群 n=24	(%)
F <sub>1</sub>	16(73)	18(75)	
F <sub>2</sub>	5(23)	5(21)	
F <sub>3</sub>	1(5)	1(4)	

p=0.99

表6 IFN による線維化の改善度

	駆除群 n=22	残存群 n=24	(%)
改善	12(54)	3(12)	
不変	4(18)	17(70)	
悪化	6(27)	4(16)	

p<0.01

の悪化を認めた。

線維化マーカーの変化については、治療前では、F<sub>1</sub>と比べF<sub>2</sub>・F<sub>3</sub>でPIIP・IV7S共に有意に高値を示した(図1)。治療後はPIIP・IV7Sともに、駆除群では有意に低下の傾向を示したが、残存群では有意な変化は認めなかった(図2)。

続いて、線維化が吸収されていく形態的变化を

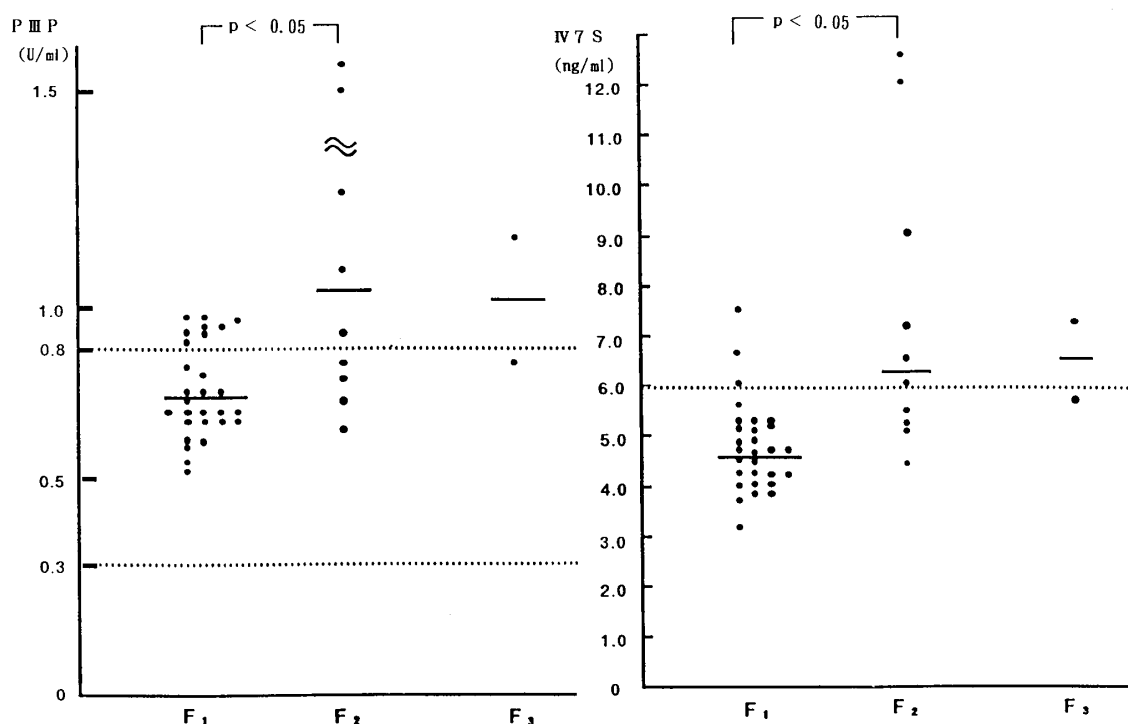


図1 IFN 治療前の血清 PIIP 値(左)と血清 IV7S 値(右)

PIIP (n=40), IV7S (n=40). PIIP, IV7S 両者とも、F<sub>2</sub>ではF<sub>1</sub>と比し有意に高値である。

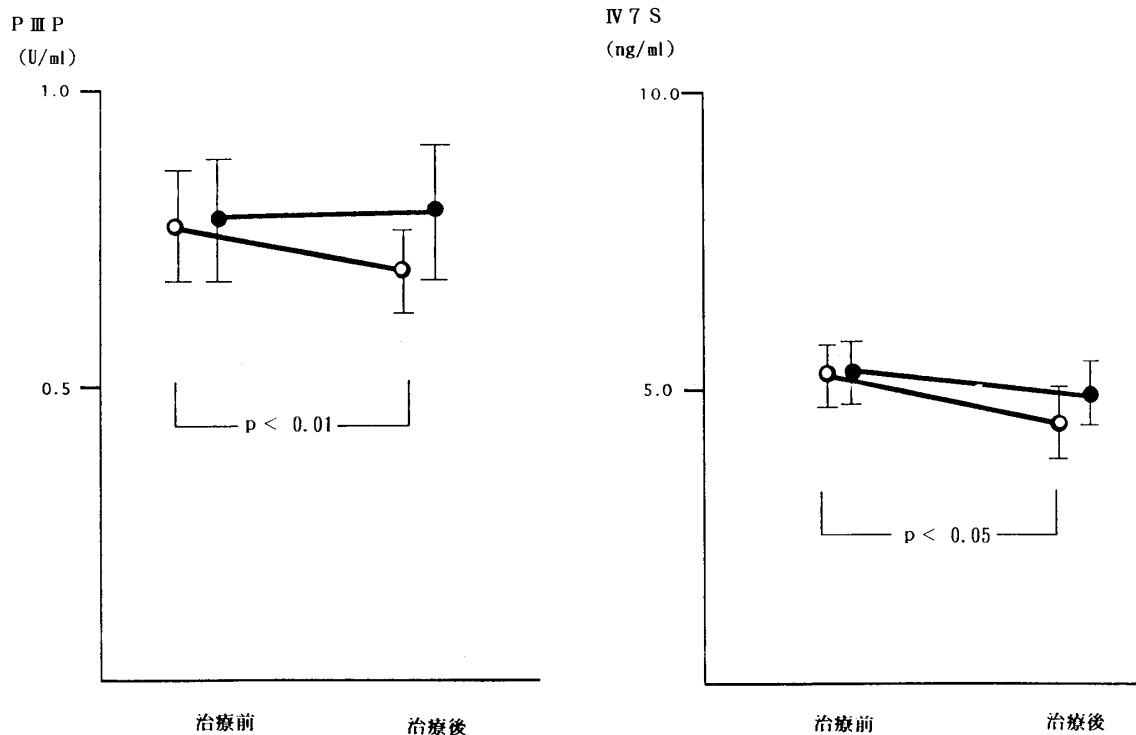


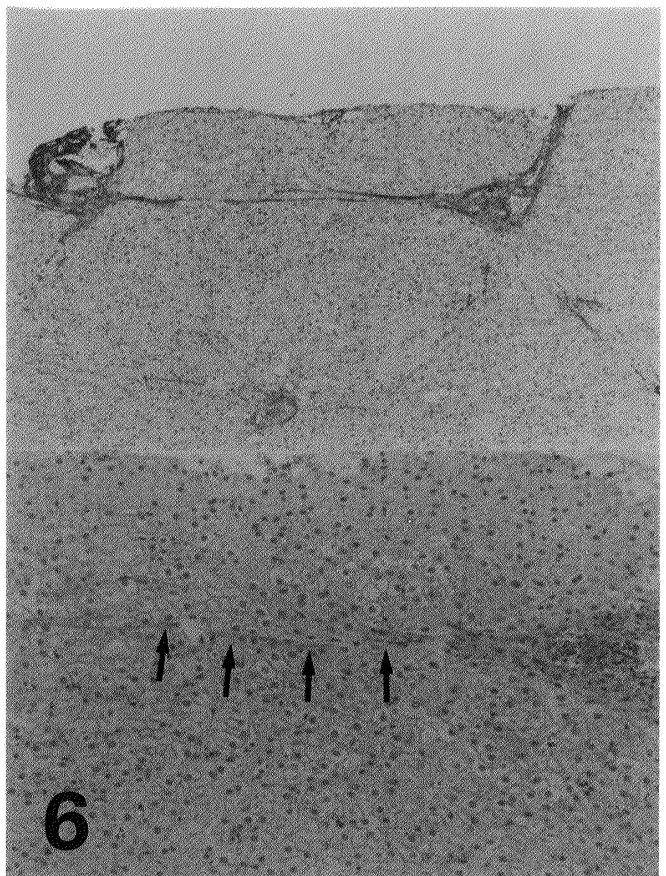
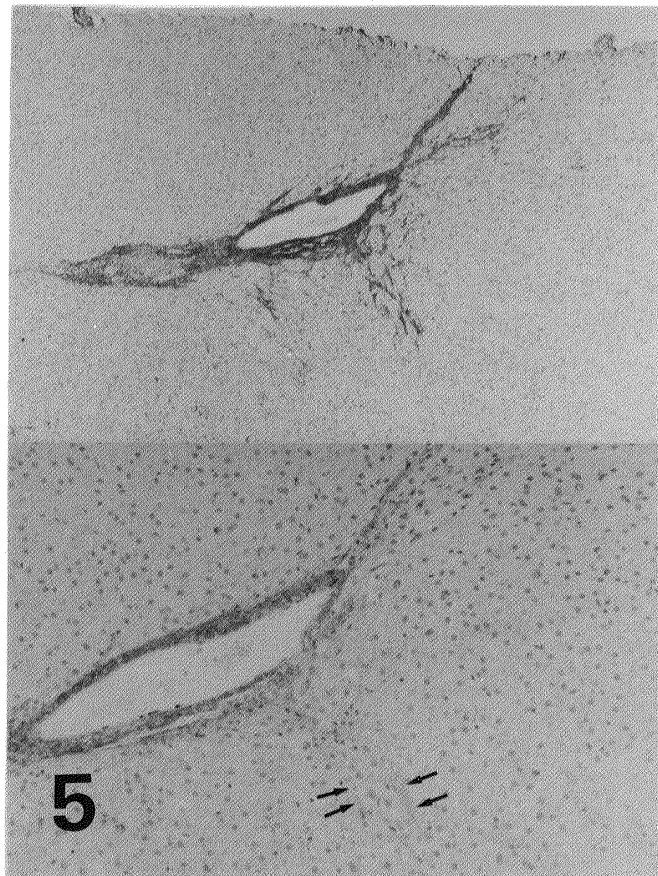
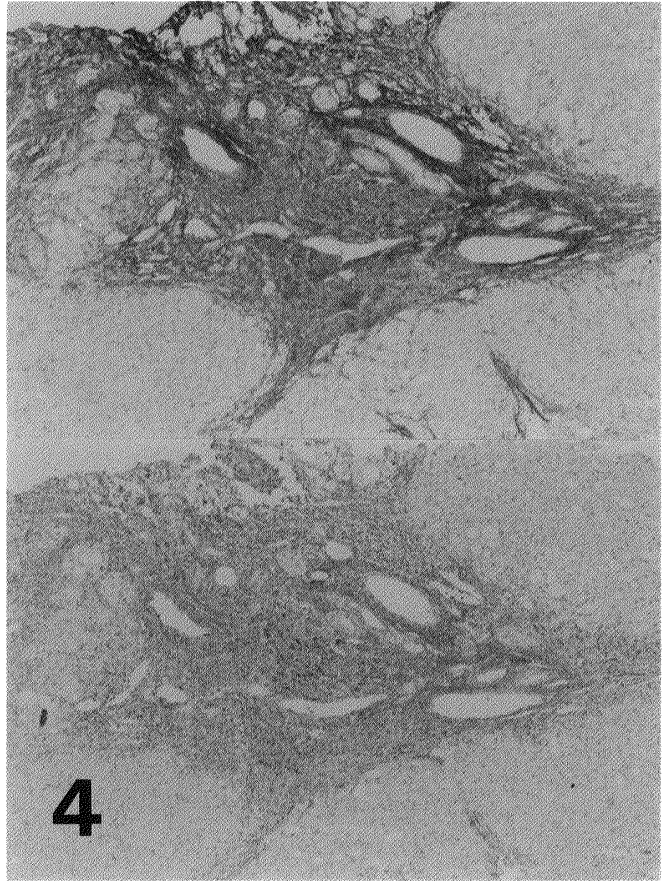
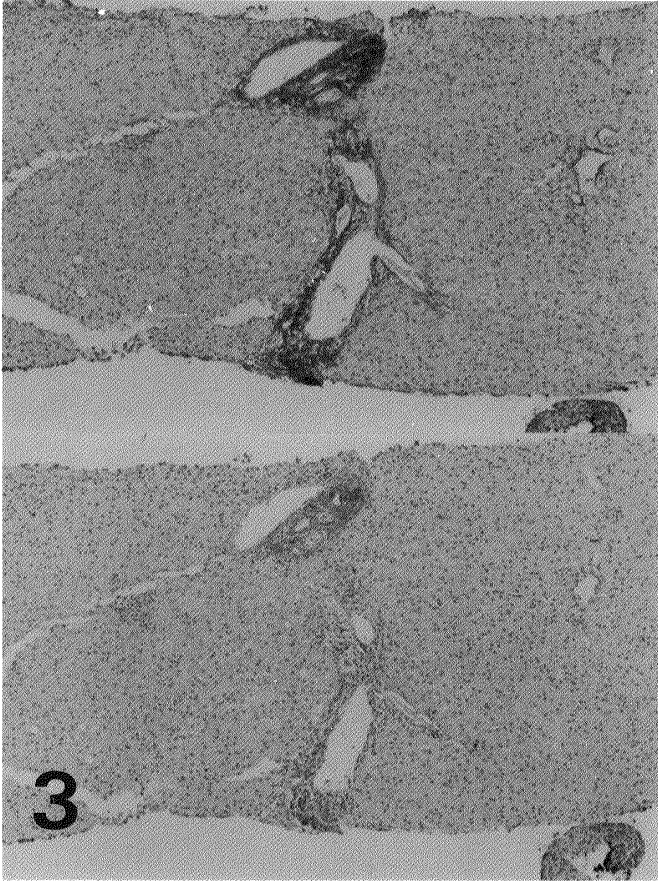
図2 IFN 治療前後での血清 PIIP 値 (左) と血清 IV7S 値 (右) の変動  
○：駆除群(n=21), ●：残存群(n=19). PIIP, IV7S 両者とも, 駆除群では, IFN 治療前後で有意に低下した. 残存群では, 有意な変化は認められなかった.

コラーゲン別に検討した. なおIII型とIV型はほぼ同じ形態を呈したため, 図ではIV型は省略しI型とIII型のみを染色を示した. IFN 治療前は, F<sub>1</sub>ではI型はグリソン鞘の中心部にのみ認められ実質内に伸びる線維化の主体はIII・IV型である(図3). しかしF<sub>3</sub>まで進展すると, 染色は薄い, I型もIII型と同様に線維化の拡大した部分に認められる(図4). 従って線維化が進むとまずIII・IV型, 続

いてI型コラーゲンがグリソン鞘から実質内に進展すると考えられる.

IFN 治療後の検討で, 線維化の改善した例では, III型コラーゲンがグリソン鞘周囲実質内に pericellular fibrosis 様に観察される. 同部位にはI型も認められ, 古い線維化の吸収過程であると考えられる(図5). 分解吸収が進むと, bridging fibrosis があったと思われる部分に, III型コラー

- 図3 IFN 治療前の F<sub>1</sub>におけるIII型コラーゲン (上 25倍) とI型コラーゲン (下 25倍)  
III型はグリソン鞘から実質内に拡大した部分にも認められるが, I型はグリソン鞘の中心部にのみ観察される.
- 図4 IFN 治療前の F<sub>3</sub>におけるIII型コラーゲン (上 25倍) とI型コラーゲン (下 25倍)  
III型・I型両者とも線維化の拡大した領域に広範囲に観察される.
- 図5 線維化改善例 (ウイルス駆除群) におけるIII型コラーゲン (上 25倍) とI型コラーゲン (下 50倍)  
III型はグリソン鞘周囲に pericellular fibrosis 様に認められる. 染色は弱い, I型も同じ領域に認められる (矢印).
- 図6 線維化改善例 (ウイルス駆除群) におけるIII型コラーゲン (上 25倍) とI型コラーゲン (下 50倍)  
III型は2カ所のグリソン鞘の間に thin septal fibrosis として観察される. 染色は弱い, I型も同じ領域に認める (矢印).



ゲンが数条の線状となって観察され、同部位には I 型も認められる (図 6)。

### 考 察

C 型 CH に対する IFN 治療効果の予測因子に関して現在までに多数報告されているが、ウイルス側の因子として代表的なものは HCV-RNA 量<sup>8)</sup>と HCV-genotype<sup>9)</sup>である。我々の症例でも、ウイルス量が  $10^5$  copies/50 $\mu$ l 未満の 30 例では、60% 以上でウイルスが駆除された。しかし、 $10^5$  copies/50 $\mu$ l 以上の 16 例では、80% 以上でウイルスが残存し、有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。HCV-genotype に関しても、他の報告と同じように、III 型では高い駆除率が認められた。宿主側の因子としては組織学的進展度が挙げられているが<sup>9)</sup>、我々の観察では、炎症所見と線維化を合わせたヨーロッパ分類においても駆除群と残存群に差はなく、また線維化を F<sub>1</sub> から F<sub>3</sub> まで分類した比較においても、両群間に差は認められなかった。肝硬変についても、HCV-RNA 量が少なければ IFN が有効であるとの報告もあり<sup>10)</sup>、IFN の治療効果を決定する本質的なものはウイルス側の因子と思われる。

IFN による C 型 CH の最終的な治療目標としては、HCV の排除とともに肝組織、特に線維化の改善・正常化である。肝の線維化については、他臓器とは異なり硝子様瘢痕がなく、障害の原因がなくなれば可逆性である可能性がある。実際に、B 型 CH の seroconversion 後やアルコール性肝線維症のアルコール中止後には線維化の改善を経験する。しかし、C 型 CH の場合は自然にウイルスが排除されることは非常に稀であり、B 型と異なり炎症も持続することが多いため、IFN 治療開始以前は、自然経過で炎症の改善をみることはないと考えられている<sup>11)</sup>。

我々の Masson 染色によるコラーゲン線維全体の観察では、IFN 治療後ウイルス駆除群の方に残存群に比べて有意な線維化の改善が認められた。駆除群 22 例中で線維化の悪化が 6 例 (27%) に認められるが、1 例は治療後飲酒を再開しておりアルコールの影響が考えられる。2 例においては HCV-RNA の陰性化にもかかわらず ALT が

正常化していない例である。他の 3 例については、sampling error を考えるが明確な原因は不明である。しかし駆除群では 50% 以上に改善が認められ、残存群では 70% 以上が不変であることより、両群間の線維化の改善に差があると考えて妥当と思われる。

Masson 染色による駆除群の線維化の改善を裏付けるため血清線維化マーカーについて検討した。今回の研究では、線維化の stage より現在の fibrogenic activity を反映する<sup>12)</sup>とされる PIIP と、肝類洞の線維化とともに肝全体の線維化の stage に相関する<sup>13)</sup>と報告される IV7S を測定した。IFN 治療前の血清 PIIP 値と IV7S は、F<sub>2</sub> の 9 例では F<sub>1</sub> の 29 例に比べて有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。F<sub>3</sub> は 2 例であり統計学的検討ができなかったが、F<sub>2</sub> とほぼ同様な値を示した。IV7S だけではなく PIIP も線維化の stage に相関したのは、C 型 CH が B 型 CH や中毒性の肝線維症と異なり、持続的に壊死性炎症反応を繰り返す、進行性に線維化が起こることに起因するものと考えられる。C 型 CH に関しては、他の文献でも同様な結果がみられる<sup>3)</sup>。

IFN 療法前後の PIIP と IV7S の比較では、残存群には変化は認められなかったが、他の報告<sup>14)</sup>のように、駆除群では両者ともに有意な低下を示した。これは、fibrogenesis の低下と fibrosis stage の改善の証拠となり、Masson 染色の結果を支持するものである。

肝線維化の構成成分としては、I 型、III 型、IV 型、V 型および VI 型コラーゲンが挙げられているが<sup>15)</sup>、線維化の主体は I 型、III 型、IV 型である<sup>16)</sup>。線維化の stage 別 (F<sub>1</sub> ~ F<sub>3</sub>) にこれらの分布を抗ヒトコラーゲン抗体を用いた免疫染色により検討すると、IFN 治療前は F<sub>1</sub> では III・IV 型が拡大する線維化の主体であり、I 型は元々線維が存在したグリソン鞘に認めるのみである。しかし、F<sub>3</sub> に進展すると III・IV 型と同様に I 型も線維化の拡大した部分にも観察された。

従来より、肝線維化の初期は III 型が増加し後期には I 型が増加するといわれており、慢性 CCl<sub>4</sub> 障害による肝線維化でも、初期には IV・III・I 型の

順にプロコラーゲン mRNA の発現を認めたとの報告<sup>17)</sup>もあり、我々の染色結果と一致するものである。つまり、I型コラーゲンの存在は、その線維化が進展してある程度時間が経過した古いものであることを意味するものと考えられる。IFN療法により線維化が改善した症例では、III・IV型が細胞間に pericellular fibrosis 様にあるいは線状に染色される部分に I 型も陽性であり、線維化の進展過程ではみられなかった所見である。これは、IFN 治療前に進展していたグリソン鞘周囲の stellate fibrosis や bridging fibrosis が分解吸収される過程を示した所見と考えられる。

C型CHなどの肝線維化の機序としては、肝実質の壊死炎症により、Kupffer細胞などから線維化を促進する transforming growth factor (TGF) $\beta_1$ などのサイトカインが放出され、伊東細胞にそれらが作用してコラーゲンなどの細胞外マトリックス (ECM) が産生される<sup>18)</sup>。このことより、肝線維化の改善の方法や機序としては、以下のことが考えられる。①肝細胞壊死の原因を除去する、②伊東細胞の活性化や増殖を抑制する、③ECM産生を促進するサイトカインの分泌を抑制する、④サイトカインレセプターの発現を抑制する、⑤collagenaseなどの分解系の活性を促進する、の5点である。

IFN $\gamma$ は、伊東細胞の抑制とI型プロコラーゲン mRNA の合成阻害により、直接的に線維化を抑制する作用があるとの報告<sup>19)</sup>がある。一方、IFN $\alpha\cdot\beta$ は、炎症の改善によりコラーゲン合成を抑えているとの考えが一般的である。しかし、Castillaら<sup>20)</sup>はIFN $\alpha$ により、TGF- $\beta_1$  mRNA やI型プロコラーゲン mRNA の発現が肝組織内で減少していることを示しており、肝線維化抑制の直接的な作用(②~④)も今後検討する必要がある。

また⑤のようなコラーゲンの分解系については、特にIFNとの関係に関しては詳細な研究がなく、IFN療法によりウイルスの駆除された症例におけるcollagenaseなどのmatrix metalloproteinase (MMP)の活性の変化や、in situ hybridizationによるそれらの局在の検討は興味あるテーマと思われる。臨床的には、肝硬変も含

め各stageの線維化がIFNによりどの位改善されるのか、またどの位の期間を要するのかが今後の検討課題であり、それには多数例での組織学的なfollow up studyを期待したい。

## 結 論

1. C型慢性肝炎に対するIFN治療により、ウイルスが駆除された症例では、組織像・血清マーカーともに線維化の改善が認められた。
2. 抗ヒトコラーゲン抗体を用いた免疫染色による検討では、線維化が進むとまずIII・IV型続いてI型コラーゲンがグリソン鞘から実質内に進展すると考えられた。
3. IFN治療による線維化改善例では、pericellular fibrosis や thin septal fibrosis の部分に、III・IV型とともにI型コラーゲンも認められ、線維化の分解吸収過程であることが示された。

本稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜りました東京女子医科大学消化器内科林直諒教授ならびに千葉大学病理部中野雅行助教授に心から感謝致します。

## 文 献

- 1) 胡 鵬飛：慢性肝炎、肝硬変の鑑別診断に対する血清線維化マーカーの有用性—血清ヒアルロン酸、タイプIVコラーゲンの検討—。肝臓 34：859-867, 1993
- 2) 髭 修平, 永坂 敦, 松嶋 喬ほか：C型慢性肝疾患に対するインターフェロン治療における肝線維化マーカーの検討。医と薬 32：731-736, 1994
- 3) 石橋一伸, 松田裕之, 保城秀雄ほか：C型慢性肝炎 Interferon 療法における血清 procollagen III peptide および type IV collagen 7S 動態の検討。肝胆膵 27(2)：295-299, 1993
- 4) 笠原彰紀, 林 紀夫, 房本英之ほか：C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法における血清線維化マーカー測定の意味。医と薬 32：712-718, 1994
- 5) 土橋 健, 佐藤正樹, 渋谷明隆ほか：C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の肝病理組織学的効果に関する研究。肝臓 36：568-576, 1995
- 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) 犬山シンポジウム記録刊行会：「慢性肝炎の組織

- 診断基準]第18回犬山シンポジウム。中外医学社、東京(1994)
- 8) 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
  - 9) 荒瀬康司, 茶山一彰, 坪田昭人ほか: HCV-RNA 陽性の C 型慢性肝炎に対するインターフェロン投与に関する検討. 肝臓 34 : 1-7, 1993
  - 10) 佐田通夫, 井手達也, 宮島一郎ほか: 肝硬変に対するインターフェロンの有効性は? 臨床医 22 : 502-503, 1996
  - 11) 小島原典子, 石黒典子, 橋本悦子ほか: 当院における C 型慢性肝炎長期観察例の自然歴—病理組織学的検討による線維化の推移を中心に—. 東女医大誌 65 : 750-757, 1995
  - 12) Biagini G, Ballardini G: Liver fibrosis and extracellular matrix. J Hepatol 8 : 115-124, 1989
  - 13) 丸山勝也, 岡崎 勲, 高木俊和ほか: アルコール性肝疾患における血清 7S コラーゲン測定の意義. 肝臓 31 : 1418-1425, 1990
  - 14) Franco C, Giovanni BG, Massimo C et al:  $\alpha$ -Interferon in the treatment of chronic viral hepatitis: effects on fibrogenesis serum markers. Hepatology 19 : 112-118, 1993
  - 15) Geerts A, Voss B, Rautenberg J et al: On the distribution of collagen, fibronectin and laminin in the normal rat liver. In Sinusoidal Liver Cells (Knock DL, Wisse E eds) pp209-222, Elsevier, Amsterdam (1982)
  - 16) Tanikawa K: Serum marker for hepatic fibrosis and related liver pathology. Pathol Res Pract 190 : 960-968, 1994
  - 17) 本村光明: 肝線維化におけるコラーゲン遺伝子の発現とその調節機構. 肝胆膵 18(3) : 397-406, 1989
  - 18) Matsuoka M, Eskreis DS, Commpton KV et al: Mitogenic effects of transforming growth factor  $\beta_1$  on human Ito cells in culture—Evidence for mediation by endogenous platelet derived growth factor. Hepatology 18 : 137-145, 1993
  - 19) Czaja MJ, Winter FR, Takahashi et al:  $\gamma$ -Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. Hepatology 10 : 795-800, 1989
  - 20) Castilla A, Prieto J, Fausto N et al: Transforming growth factors  $\beta_1$  and  $\alpha$  in chronic liver disease effect of interferon alfa therapy. N Engl J Med 324 : 932-940, 1991