

C型慢性肝炎におけるHCV-免疫複合体形成と インターフェロン治療効果との関係

真 鍋 良 二

キーワード；HCV, chronic hepatitisC, HCV-immune complexes

緒 言

Watoら¹⁾は、C型慢性肝炎症例の組織分類による肝組織障害の程度とHCVのウイルス量をそろえてInterferonの有効性を調べると、比重密度勾配法で上清分画にウイルス量が多い症例の方がIFN抵抗性の傾向があると報告している。一方、この研究は、定性的判断に基づいていること、比重の差だけで分離し、その重い部分が抗原抗体複合体であるかは不明であること、また、他の施設^{2,3)}からは、組織病型を統一していないが、HCV粒子の免疫複合体が多いほどIFNの無効例が多いなど相反する成績も報告されており、一致した成績はない。

今回は、すでにIFN治療を行ったC型慢性肝炎症例の中でIFN耐性の多いGenotype 1bの症例について、厚生省のIFN判定基準（1991年）^{4,5)}でIFN有効（Complete Response：CR）であったものと無効（Non-Response：NR）であった症例を対象とし、retrospectiveに、IFN投与前のHCV RNAが同じウイルス量（遊離のウイルスと免疫複合体中のウイルスの総量）であり、かつ組織病型を一致させて、抗ヒト免疫グロブリン抗体を血清に添加して、人工的に免疫複合体と上清に分離し、各分画のHCV RNA量を微量から高濃度まで比較的直線的に測定可能とされるReal-time PCR法⁶⁾で測定・解析することにより、IFNの治療効果をIFN投与開始前に予想すること

が可能かどうかを検討したので報告する。

対 象 と 方 法

対象：Genotype 1bでアンプリコア法¹⁾による定量でほぼ同程度の治療前のウイルス量であり、同時に肝組織病型が新犬山分類⁷⁾でfibrosis (F)の程度がⅡ～ⅢのC型慢性肝炎症例のうち、年齢、性別も同じように考慮して、IFN有効例（CR例）5例とIFN無効例（NR例）5例のIFN治療前日の血清を研究対象とした。各々の年齢、性別を含む臨床背景を表1に示した。

方法：各保存血清100 μ lを蒸留水で1mlに希釈し、抗ヒトIgG+A+Mウサギ抗体（DAKO社）42.9 μ lを添加、室温で2時間攪拌後、15,000rpm15分間遠沈し上清（Sup）と沈渣（Ppt）を分離し沈渣は生理食塩水1mlに溶解した。なお、各々の詳細はさきの報告⁸⁾に従った。上清と沈渣をそれぞれ0.5mlずつ、SRL社に提出し、Real-time PCR法⁶⁾で定量を行った。

一方HCV RNA定量のために、希釈法による半定量的reversetranscription-PCR（RT-PCR）法⁹⁾による解析も実施した。各上清（Sup）と沈渣（Ppt）をさきの方法で、

表1 対象症例の臨床的背景

症例NO	性別	年齢	採血日	IFN効果
1	M	50	1998.01.27	C R
2	M	41	1996.10.21	C R
3	F	55	1997.07.08	C R
4	F	53	1997.05.19	C R
5	M	36	1996.11.25	C R
6	M	45	1996.04.19	N R
7	F	65	1996.08.28	N R
8	M	41	1998.03.23	N R
9	M	42	1996.03.04	N R
10	M	39	1997.01.22	N R

（平成14年1月16日受理）

指導：辻 孝夫教授（岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学（内科学第一））

論文請求先：コープみんなの診療所

〒703-8228 岡山市乙多見101番地-4

真鍋良二

電話：086-278-8522 FAX：086-278-8523

E-mail：minna@mb.okay.or.jp

最終的に1 mlに溶解したもののうち0.5mlをSRL社に提出した残りの0.5mlを用い、5 μ lからスタートし、生理食塩水で100倍、1,000倍、10,000倍希釈液を作成し、各々希釈液を200 μ lずつ用いて、Nakagawa⁹⁾らの方法に準じてRT-PCRを行った。増幅産物は3%アガロースゲル電気泳動後、エチジウム ブロマイドにより染色し写真撮影した。

表2 免疫沈降後の分画別HCV RNA量とINF治療効果

症例NO	IFN効果	Amplicor法 (a)	Sup (b)	Ppt (b)	S/P (b)	S+P (b)
1	CR	280	38,000	7,300	5.21	45,300
2	CR	270	20,000	900	22.22	20,900
3	CR	1,800	170,000	28,000	6.07	198,000
4	CR	490	6,200	1,100	5.64	7,300
5	CR	230	36,000	1,100	32.73	37,100
6	NR	260	4,300	3,200	1.34	7,500
7	NR	660	110,000	44,000	2.5	154,000
8	NR	280	2,000	3,700	0.54	5,700
9	NR	350	24,000	33,000	0.73	57,000
10	NR	170	74,000	2,100	35.24	76,100

^AAmplicor法 (HCV RNA K copy/ml), ^BReal-time PCR法 (HCV RNA copy/ml)

結 果

CR例とNR例のアンプリコア法によるHCV RNA量の測定は、表2に示すようにCR群とNR群の間には有意な差はなかった。

Real-time PCR法による各症例のSupとPptの成績については、表2に示すようにCR群(症例No.1~No.5)とNR群(症例No.6~No.10)において、アンプリコア法による測定結果はK copyにより表しReal-time PCRはSupとPptに区別し、各々、Sup (S) 単独、Ppt (P) 単独、Sup/Ppt (S/P)、両者の和 (S+P) についても検討を行って見た。CR群がSup/Pptで大きい傾向に ($p=0.1172$)、Ppt単独で少ない傾向に ($p=0.1732$) あったが有意な差は認めなかった。また、Sup+Ppt (S+P) の和は表2のように7300から19,800まで、幅広い分布を示していた。同量のPpt溶解液とSupを採取しているの、両者の和はほぼ一定になると予想していたが、結果は広い範囲に分布していた。(表2)

一方、SupとPptを各々希釈して行った半定量的RT-PCR法による結果は、図1に示す通りであり、各々の希

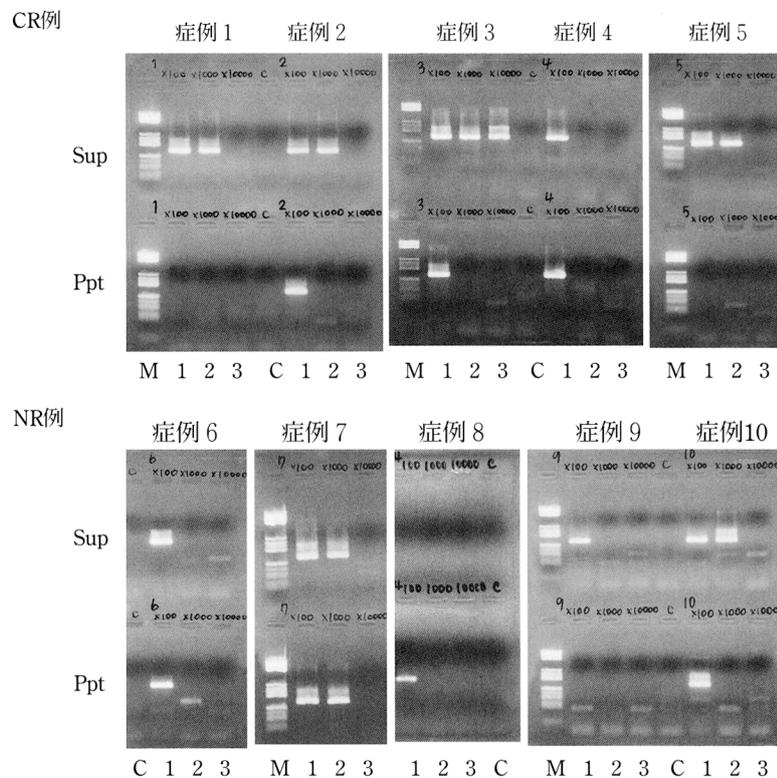


図1 半定量的RT-PCRによる免疫沈降分画におけるHCV
 レーン1: 100倍希釈検体, レーン2: 1,000倍希釈検体, レーン3: 10,000倍希釈検体, M: DNA size marker (DNA Molecular Weight Marker V, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan), C: 陰性対照 (生理的食塩水のみ)

表3 免疫沈降後のHCV RNA量とIFN治療効果 —一定量法による比較—

症例NO	IFN効果	Amplicor法 (a)	Real-timePCR法 (b)		100倍希釈 (c)	1000倍希釈 (c)	10000倍希釈 (c)	
			S u p	P p t				
1	C R	280	45,300	S u p	38,000	+	+	-
				P p t	7,300	-	-	-
2	C R	270	20,900	S u p	20,000	+	+	-
				P p t	900	+	-	-
3	C R	1,800	198,000	S u p	170,000	+	+	+
				P p t	28,000	+	-	-
4	C R	490	7,300	S u p	6,200	+	-	-
				P p t	1,100	+	-	-
5	C R	230	37,100	S u p	36,000	+	+	-
				P p t	1,100	-	-	-
6	N R	260	7,500	S u p	4,300	+	-	-
				P p t	3,200	+	-	-
7	N R	660	154,000	S u p	110,000	+	+	-
				P p t	44,000	+	+	-
8	N R	280	5,700	S u p	2,000	-	-	-
				P p t	3,700	+	-	-
9	N R	350	57,000	S u p	24,000	+	-	-
				P p t	33,000	-	-	-
10	N R	170	76,100	S u p	74,000	+	+	-
				P p t	2,100	+	-	-

^AAmplicor法 (HCV RNA K copy/ml), ^BReal-time PCR法 (HCV RNA copy/ml), ^C半定量的RT-PCR法, ^DS+P

積倍数における検出感度は明確であったが、個々のIFN治療効果との関連については差がなかった。(表3)

考 察

C型慢性肝炎症例において、①ウイルス量が多い、②Genotypeが1bである、③NS5Aが野生型である、④肝組織の線維化fibrosis (F) が進行している、⑤血小板が低値である症例などはIFNの治療効果が乏しいと考えられている^{10,11)}。しかし、同じ1bにおいてもウイルス量が多いにもかかわらず治療効果がある症例 (CR例) があり、その有効性の原因については不明のままである。

今回、私は、さきのAraki⁸⁾らの成績から考えられるようにC型慢性肝炎症例の血中において、同じHCV RNA量であってもすでにHCV粒子に対する抗体ができており、soluble immune complexとしてウイルス粒子に免疫グロブリンが結合しているものがあると考え、抗ヒトIgG+A+M抗体を用いて、免疫グロブリンが結合したHCV粒子と遊離のHCV粒子を選別して各々のHCV RNA量を測定しその結果からIFNの投与前に、IFNの治療効果が予想できるか否かを検討した。

その結果、Wato¹⁾らが粒子の重い方、すなわち沈渣のHCV RNA量が多い方が、そして上清に少ない方が若干IFN治療効果が高いとした報告と異なり、免疫グロブリンを結合している (沈渣のHCV RNA) 比率が小さい方

が、また沈渣のHCV RNA単独で少ない方にIFN治療効果が高い (CR) 例が多い傾向があったが、統計的には有意な差はなかった。一般的にはC型慢性肝炎例では、血清トランスアミラーゼ値が高い症例あるいは変動している症例に、よりIFNの治療効果がある¹⁰⁾といわれており、沈渣のHCV RNA量が多い症例では血清トランスアミラーゼ値の変動も予想され、効果が多いと予想されたが必ずしも一定の傾向ではなかった。

今回は、抗体の量をあらかじめ一定にしており症例数が少なかったため、今後、添加する抗体量を多くしたり症例を重ねること、特に1b以外の2aや2bなどの他のGenotypeも併せて検討する事により有意な成績が得られるのではないかと考えられた。

また、免疫グロブリン結合HCV粒子と血清トランスアミナーゼの急性増悪との関係に関して、現時点ではほとんど報告がみられない。すでに報告⁸⁾されているように、C1qを結合するような免疫複合体は、慢性肝炎の急性増悪の前後で高く、急性増悪期では低下していることなどが、B型肝炎と非A非B型肝炎では明らかにされているが、免疫グロブリン結合HCV粒子については、さらに知見が集積されることにより、今後、興味ある結果が得られる可能性が示唆された。

なお、アンプリコア法により測定したHCV RNA量を一定にしても、Real-time PCR法では種々のばらついた定

量値が得られる所から、HCV RNAの正確な定量は困難であること、さらに今回行ったような100倍、1,000倍、10,000倍希釈など、希釈法による半定量法もHCV RNA量の定量法として有用であることが示唆された。

結 論

アンプリコア法によるHCV RNA量がほぼ等しいGenotype 1bのC型慢性肝炎症例10例（IFN有効例（CR例）5例IFN無効例（NR例）5例）についてIFN治療効果を投与前にHCV粒子に対する免疫グロブリンの結合状態から予想することができるか否か検討した。

その結果、免疫グロブリンを結合したHCV粒子（沈渣のHCV RNA）の比率が小さい方に、また沈渣のHCV RNA単独で少ない方にCR例が多い傾向にあったが、有意とはいえない結果を得た。HCV RNAの定量は、アンプリコア法とReal-time PCR法で一致しない症例もあり、血清希釈法による半定量的RT-PCR法による測定もHCV RNA定量法として有用と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った恩師岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科学（第一内科）講座の辻 孝夫教授に深謝いたします。また、直接実験の指導をいただいた同講座の下村宏之講師、岩崎良章助手と梶谷浩子技術補佐員と論文完成に御助力いただいた久田典子教授秘書に感謝いたします。

文 献

- 1) Wato M, Shimomura H, Fujio K, Tsuji H, Kondo J, Fujioka S, Ishii Y, Hada H and Tsuji T: Relationship between response to interferon therapy and detection of hepatitis C virus RNA differential flotation centrifugation. *Acta Med Okayama* (1996) 50, 139-144
- 2) Kanto T, Hayashi N, Takehara H, Hagiwara H, Mita E, Naito M, Kasahara A, Fusamoto H and Kamada T: Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: Two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation. *Hepatology* (1994) 19, 296-302
- 3) Kanto T, Hayashi N, Takehara H, Hagiwara H, Mita E, Naito M, Kasahara A, Fusamoto H and Kamada T: Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation infected hosts: Implications for virus neutralization or persistence. *J Hepatol* (1995) 22, 440-448
- 4) 飯野四郎: C型慢性肝炎の治療. 厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班 平成三年度研究報告 (1991) 191-193
- 5) 飯野四郎: C型慢性肝炎のインターフェロン治療. 厚生省特定疾患難治性の肝炎調査研究班平成五年度研究報告 (1993) 21-24
- 6) Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S and Kohara M: Real-time detection system for quantification hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* (1999) 116, 636-642
- 7) 辻 英之、辻 孝夫: 新しい慢性肝炎組織診断基準（新犬山分類）とB型・C型肝炎. *医学のあゆみ* (1999) 190, 769-773
- 8) Araki K, Nagashima H and Tsuji T: Detection and characterization of circulating immune complexes during acute exacerbation of chronic viral hepatitis. *Clin exp Immunol* (1982) 47, 520-526
- 9) Nakagawa H, Shimomura H, Hasui T, Tsuji H and Tsuji T: Detection of negative stranded RNA of hepatitis C virus in infected liver and serum. *Acta Med Okayama* (1993) 47, 311-316
- 10) 辻 孝夫: 慢性ウイルス肝炎の病態と治療. *日内会誌* (2001) 90, 1633-1642.
- 11) 林 紀夫: C型肝炎の治療法: 慢性肝炎治療マニュアル, 日本肝臓学会 監修・日本肝臓学会企画広報委員会編, 医学書院, 東京 (2001) pp60-68

**Relationship between formation of HCV-bearing immune complexes and
response to interferon therapy for chronic hepatitis C**

Ryouji MANABE

Department of Medicine and Medical Science, Okayama University

Graduate School of Medicine and Dentistry

Okayama 700-8558, Japan

(Director : Prof. T. Tsuji)

We retrospectively analyzed the relationship between formation of HCV-bearing immune complexes (HCV-IC) and response to interferon (IFN) therapy for chronic hepatitis C (CH-C). Five CH-C patients with complete response (CR) to IFN therapy and pre-treatment HCV RNA titer measured by Amplicor HCV-monitor and five stage (biopsy proved fibrosis of the liver)-matched CH-C patients who were non-responders (NR) to IFN therapy were enrolled. Pre-treatment sera were separated into HCV-IC (supernatant) and anti-HCV antibody-free virions (pellet) by addition of anti-human immunoglobulins and centrifugation. HCV RNA was quantified in the supernatant and the pellet, by real-time PCR and semi-quantitative RT-PCR respectively. There were discrepancies in the HCV RNA titers measured by Amplicor and the results of real-time PCR. We found a larger quantity of HCV RNA in the supernatant and a smaller quantity in the pellet in CR than in NR by using real-time PCR. Our data indicate that response to interferon therapy for CH-C patients may be associated with the conditions underlying the formation of HCV-IC.