<原 著>

インターフェロン治療例における肝組織中 HCV-RNA の 変化と治療効果についての検討

竹内 正勇*

要 旨：インターフェロン (IFN) 療法時の肝組織中 HCV-RNA の動態と治療効果の関連を明らかにするために、C 型慢性肝炎患者 30 例を対象に IFN 前後の血中および肝組織中 HCV-RNA の測定を行った。治療前の HCV-RNA は血中では 30 例中 29 例 (96.7%)、肝組織中では測定した 14 例すべてに陽性であったが、治療終了時には血中では 6 例 (20%)、肝組織中では 11 例 (36.7%) に陽性であった。また、治療前後の肝組織中ウイルス量は 13 例において測定され、1 例を除く全例に低下が認められた。一方、治療効果との関連では、治療終了時の肝組織中 HCV-RNA 陽性例は全例再燃を認めた。しかし、治療終了時、血中・肝組織中とも HCV-RNA 陰性であっても、著効は 18 例中 8 例 (44%) のみであった。以上の結果から、IFN 終了時、血中で陰性化しても肝組織中に HCV-RNA が残存する例があり、これらの症例では全例再燃が認められること、さらに肝組織中の HCV-RNA が消失しても再燃する例が存在することが示された。

索引用語： C 型慢性肝炎 インターフェロン療法 肝組織中 HCV-RNA

はじめに

近年、C 型慢性肝炎に対する治療としてインターフェロン (IFN) 療法が行われ、C 型肝炎ウイルス (HCV) RNA の持続陰性化など、その有効性が報告されてきた¹⁻⁷⁾。これまでの検討において、HCV-RNA は血清を材料として、polymerase chain reaction (PCR) 法、DNA probe 法で定性的あるいは定量的に評価され⁵⁻⁸⁾、IFN 療法終了時の血中 HCV-RNA の陰性化率は 60~80% 以上と報告されている⁵⁻⁷⁾。しかしながら、治療終了後 6 カ月では約 50% に HCV-RNA の再出現を認めることが知られている⁵⁻⁷⁾。この血中 HCV-RNA が再出現する機序として、血中に測定法の感度以下の HCV 粒子が存在している可能性や、血中には存在していなくとも肝組織中に HCV が残存している可能性等が考えられているが、IFN 療法時の肝組織中 HCV-RNA の推移についてはこれまで報告が少なく、未だ不明な点が多く残されている。そこで、IFN 療法時の肝組織中 HCV-RNA の動態を明らかにするために、本研究では IFN 療法前後の肝組織中 HCV-RNA を定性的に、一部定量的に測定し、さらに、血清

alanine aminotransferase (ALT) 値から評価した治療効果との関連についても検討した。

対象と方法

1. 対象

金沢大学医学部第 1 内科およびその関連病院において、第 2 世代の HCV 抗体陽性で組織学的に慢性肝炎と診断され、IFN 療法を行った 30 例を対象とした。平均年齢は 48.4 ± 11.4 歳、男性 20 例・女性 10 例、治療前平均 ALT 値は 98.5 ± 82.5 であった。IFN は 14 例に recombinant IFN- α (2a: 4 例, 2b: 10 例) を、16 例に IFN- β を用いた。IFN 投与方法は IFN- α 使用例では 6 Megaunits (MU) 2 週連日投与後、週 3 回 14~22 週投与 (総投与量 336~480 MU) とし、IFN- β 使用例では 8 週連日投与 (総投与量 336 MU) とした。IFN 治療効果は厚生省・難治性の肝炎調査研究班の判定基準にしたがい、著効例 (excellent)・有効例 (good)・不変あるいは悪化例 (no response) に分けて評価した。治療前の組織診断は chronic persistent hepatitis (CPH) 8 例・chronic active hepatitis (CAH) 2A 19 例・CAH 2B 3 例であった。血中 HCV-RNA は全例において治療前後で測定し、肝組織中 HCV-RNA は 14 例において治療前後で、16 例において治療後にのみ測定した。

Masayu TAKEUCHI*

*金沢大学第 1 内科

<受付日 1994 年 2 月 21 日>

2. 血中 HCV-RNA の測定

IFN 療法の直前および直後 1 週間以内に採血を行い、測定まで -40°C にて保存した。以前報告⁹⁾したごとく、血清 $10\mu\text{l}$ を用い、5'non coding 領域の合成 DNA (outer primer set: sense: 5'-ACTCCACCATAGATCACTCC-3'・antisense: 5'-TTGTGCTCATGGTGCACGGTCTACG-3', inner primer set: sense: 5'-ATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTG-3'・antisense: 5'-TCATGGTGCACGGTCTACGAGACCT-3') を primer とし、reverse transcription-nested PCR を single tube 内にて行った。PCR 産物は agarose gel 電気泳動後 ethidium bromide 染色にて 310bp バンドの検出を行った。また、28 例において、Okamoto ら¹⁰⁾の方法に従い、core 領域に設定した type-specific primer を用いて HCV の genotype を判定した。

3. 肝組織中 HCV-RNA の測定

IFN 前の肝生検は治療開始 2 週間前までに施行した。IFN 後の肝生検は 27 例において治療終了直前あるいは直後 5 日間以内に施行し、3 例において治療終了後 10 日から 2 週間で施行した。肝生検は Vim-Silverman 針あるいは Menghini 針を用い、約 5mm 切片を採取後即座に液体窒素あるいはドライアイスにて凍結させ、測定まで -70°C に保存した。肝組織中 HCV-RNA の調整は acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法¹¹⁾を用いて行い、 $22\mu\text{l}$ の diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water にて溶解後、半量を測定に用いた。cDNA の合成には、調整した RNA 溶液に outer primer set (血中 HCV-RNA の測定に用いたものと同じ) を、それぞれ 90pmol を加え 70°C にて 7 分間加熱後、室温で 10 分間 annealing し、その後 ribonuclease inhibitor (Promega Biotech, Madison, WI, USA) 40units, 10mM dNTP $2.5\mu\text{l}$, 100mM dithiothreitol $2.5\mu\text{l}$, $\times 10$ reverse buffer (30mM MgCl_2 , 500mM Tris-hydrochloric acid pH 8.3, 750mM KCl) $2.5\mu\text{l}$, avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Promega) 10units を加えて、 42°C にて 60 分間反応した。反応後 Taq polymerase (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) 5units, $\times 10$ Taq buffer (15mM MgCl_2 , 500mM Tris-hydrochloric acid pH 8.3, 750mM KCl, 0.1% v/w gelatine) $7.5\mu\text{l}$, DEPC treated water $67\mu\text{l}$ を加え総量を $100\mu\text{l}$ とした後、 94°C で 3 分間加熱し、つづいて programmable thermal cycler (Perkin Elmer Cetus)

を用いて 30cycle (94°C 1 分間, 42°C , 1.5 分間, 72°C 3 分間) の first stage PCR を行った。つづいて反応産物 $10\mu\text{l}$ を用いて、inner primer set を加え、first stage PCR と同様に 25cycle の second stage PCR を行った。PCR 産物は 3% agarose gel にて電気泳動し、ethidium bromide 染色にて 310bp バンドを検出することにより判定した。肝組織中 HCV-RNA の定量には、 -70°C に保存した RNA を DEPC treated water にて希釈し、その検出限界により $10^0 \cdot 10^1 \cdot 10^2 \cdot 10^3 \cdot 10^4$ 希釈以上の 5 段階で評価した。

結 果

1. IFN 治療前後における血中および肝組織中 HCV-RNA の推移

1) 治療前

治療前の血中 HCV-RNA は CPH 1 例をのぞく全例に陽性であった。一方、治療前の肝組織中 HCV-RNA は血中 HCV-RNA 陰性であった 1 例を含め、測定した 14 例すべてが陽性であった (Table 1)。また、genotype 分類は、II 型 20 例 (71.4%), III 型 2 例 (7.1%), IV 型 2 例 (7.1%), 分類不能 4 例 (14.3%) であった。

2) 治療終了時

治療終了時の血中 HCV-RNA は 30 例中 6 例 (20%) が陽性であった。一方、肝組織中 HCV-RNA は、治療前に陽性であった 14 例では 5 例 (35.7%), 治療後のみ測定した 16 例では 6 例 (37.5%), 合計 30 例中 11 例 (36.7%) が陽性であり、治療終了時の肝組織中 HCV-RNA 検出率は血中 HCV-RNA 検出率に比し高率であったが、有意差は認められなかった。

3) 治療終了時における血中と肝組織中の HCV-RNA の関連

IFN 終了時の血中 HCV-RNA と肝組織中 HCV-RNA の関連について検討したところ、血中 HCV-RNA 陽性の 6 例中 5 例 (83.3%) が肝組織中 HCV-RNA 陽性であり、一方、血中 HCV-RNA 陰性の 24 例では、6 例 (25%) が肝組織中 HCV-RNA 陽性であった (Table 2)。

4) 治療前後における肝組織中 HCV-RNA 量の変化

治療前後において肝組織中 HCV-RNA 量を定量した 13 例の成績を Fig. 1 に示す。治療前の肝組織中 HCV-RNA 量は 10^1 希釈が 2 例, 10^2 希釈が 7 例, 10^3 希釈が 2 例, 10^4 希釈以上が 2 例であった。治療後には 8 例 (61.5%) において肝組織中 HCV-RNA の陰性化を

Table 1 Change of liver histology and presence of HCV-RNA in serum and liver tissue before and after IFN therapy.

Case	IFN	Response to IFN	Histology		Genotype	HCV-RNA			
			before	after		serum		liver	
						before	after	before	after
1	α -2a	excellent	CPH	CPH	UC	-	-	+	-
2	α -2b	excellent	CAH2A	NSC	UC	+	-	ND	-
3	α -2b	excellent	CAH2A	CAH2A	II	+	-	ND	-
4	α -2b	excellent	CAH2A	CAH2A	ND	+	-	ND	-
5	α -2b	excellent	CAH2A	CAH2A	ND	+	-	ND	-
6	β	excellent	CAH2A	CAH2A	II	+	-	+	-
7	β	excellent	CPH	CPH	II	+	-	ND	-
8	β	excellent	CPH	CPH	II	+	-	ND	-
9	α -2b	good	CAH2A	CPH	II	+	+	+	+
10	α -2b	good	CAH2A	CAH2A	II	+	+	ND	+
11	β	good	CAH2A	CPH	II	+	+	+	+
12	β	good	CAH2A	CAH2A	II	+	-	ND	+
13	β	good	CPH	CPH	II	+	-	ND	+
14	α -2b	good	CPH	NSC	III	+	-	+	-
15	β	good	CPH	CPH	UC	+	-	ND	-
16	β	good	CAH2A	CAH2A	II	+	-	+	-
17	α -2a	no response	CAH2A	CAH2A	III	+	+	ND	+
18	α -2b	no response	CAH2A	CAH2A	IV	+	+	+	+
19	α -2a	no response	CPH	CPH	II	+	+	+	-
20	α -2b	no response	CAH2A	CPH	II	+	-	+	+
21	α -2b	no response	CAH2A	CPH	II	+	-	ND	+
22	β	no response	CAH2B	CAH2B	II	+	-	ND	+
23	β	no response	CAH2B	CAH2B	II	+	-	+	+
24	α -2a	no response	CAH2A	CPH	UC	+	-	+	-
25	β	no response	CAH2A	CPH	II	+	-	ND	-
26	β	no response	CPH	CPH	II	+	-	ND	-
27	β	no response	CAH2A	CPH	II	+	-	+	-
28	β	no response	CAH2A	CAH2A	II	+	-	+	-
29	β	no response	CAH2B	CAH2B	II	+	-	+	-
30	β	no response	CAH2A	CPH	IV	+	-	ND	-

NSC, non-specific change ; UC, unclassifiable ; ND, not done.

Table 2 Relation ship between the presence of HCV-RNA in serum and in liver tissue at the end of IFN therapy.

serum \ liver		
	+	-
+	5(16.7%)	1(3.3%)
-	6(20%)	18(60%)

認め、治療後も HCV-RNA 陽性の 5 例では、 10^0 希釈が 1 例、 10^1 希釈が 3 例、 10^3 希釈が 1 例であった。なお、治療前後の HCV-RNA 量の推移では、1 例を除く全例に減少が認められ、その差は有意であった ($p=0.0001$)。

5) 治療終了時の肝組織中 HCV-RNA 陰性例における背景因子の検討

治療終了時の肝組織中 HCV-RNA 陰性の背景因子を検討した。平均年齢では、肝組織中 HCV-RNA 陰性例 46.4 ± 11.7 歳、陽性例 51.9 ± 9.9 歳で差はなかった。治療前の組織診断別では CPH 8 例中 7 例 (87.5%)、CAH2A 19 例中 11 例 (57.9%)、CAH2B 3 例中 1 例 (33.3%) において治療終了時の肝組織中 HCV-RNA は陰性化し、組織学的進展度が軽度の症例に肝組織中 HCV-RNA の陰性例が多くみられたが、有意差は認められなかった。また、HCV の genotype との関連では、II 型 20 例中 11 例 (55%)、III 型 2 例中 1 例 (50%)、IV 型 2 例中 1 例 (50%) において肝組織中 HCV-RNA の

Fig. 1 Comparison of HCV-RNA titers in liver tissue before and after IFN therapy.; Assays were carried out by 10-fold serial dilutions of RNA from liver tissue specimen. The shadowed area indicates negative HCV-RNA in the specimen examined.

陰性化を認めた。さらに、治療前ウイルス量との関連では、肝生検検体当たり 10^3 希釈以下の、ウイルス量の比較的少ない群では9例中6例(66.7%)にHCV-RNAの陰性化を認め、一方 10^5 あるいは 10^7 希釈以上の4例では2例(50%)にHCV-RNAの陰性化を認めた。

2. IFN 治療終了時の肝組織中 HCV-RNA と治療効果

対象とした30例のIFN治療効果は著効8例(26.7%)、有効8例(26.7%)、不変あるいは悪化14例(46.7%)であった(Table 1)。治療終了時の血中HCV-RNAとの関連では、血中HCV-RNAは、著効8例では全例陰性であったが、有効8例中6例(75%)、不変あるいは悪化14例中11例(78.6%)においても陰性化を認め、治療効果にかかわらず陰性化率は高率であった。

一方、治療終了時の肝組織中HCV-RNAと治療効果との関連では、肝組織中HCV-RNAは著効8例では全例、有効8例では3例(37.5%)、不変あるいは悪化の14例では8例(57.1%)が陰性であり、著効例における陰性化率が高く、その差は有意であった($p < 0.05$)。また、治療効果を治療終了時のHCV-RNA測定結果から検討すると、IFN終了時に肝組織中HCV-RNAが陽性であった11例には著効例を認めず、治療

Table 3 Response to IFN in patients who were negative for HCV-RNA in serum at the end of therapy.

HCV-RNA		No.	Response to IFN		
serum	liver		excellent	good	no response
(+)	(+)	6	0	2	4
(-)	(-)	18	8	3	7

Fig. 2 Serial changes of serum ALT levels in patients with chronic hepatitis C treated with IFN.; (a) patients who were negative for HCV-RNA in serum but positive in liver tissue at the end of IFN therapy. (b) excellent responders who were negative for HCV-RNA in both serum and liver tissue at the end of therapy. (c) good or non-responders who were negative for HCV-RNA in both serum and liver tissue at the end of therapy. Mo., months.

終了時に肝組織中HCV-RNAが陰性の19例では、著効8例(42%)、有効3例(15.8%)、不変あるいは悪化8例(42%)であった。

次に、治療終了時の血中HCV-RNA陰性例24例において、肝組織中HCV-RNA別に治療効果を検討し

Table 4 Clinicopathological and genetical features of "excellent" and "non-excellent" responders for IFN therapy who were negative for HCV-RNA in both serum and liver tissue.

Response to IFN	Excellent	Non-excellent
No.	8	10
IFN (α/β)	5/3	2/8
age	41.4 $\pm$ 11.1	51.2 $\pm$ 10.6
male/female	7/1	7/3
blood transfusion (+/-)	4/4	5/5
s-ALT (IU /l)	75.3 $\pm$ 71.0	87.6 $\pm$ 59.2
genotype (II/III/IV/UC/ND)	4/0/0/2/2	6/1/1/2/0
liver histology (CPH/CAH2A/CAH2B)	3/5/0	3/6/1

UC, unclassifiable; ND, not done; CPH, chronic persistent hepatitis; CAH, chronic active hepatitis.

た(Table 3). 血中陰性で肝組織中に HCV-RNA が検出された6例では、全例経過中に ALT 値の上昇を認めた (Fig. 2a). 一方、IFN 治療終了時に血中・肝組織中ともに HCV-RNA が陰性となった18例では、著効例は8例であり (Fig. 2b), 有効3例, 不変あるいは悪化7例であった (Fig. 2c).

さらに、血中および肝組織中の HCV-RNA が両者陰性であった18例について、著効となった群と再燃を認めた群に分け、その臨床・ウイルス学的背景を比較検討したが明らかな差は認められなかった (Table 4).

考 察

非 A 非 B 型あるいは C 型慢性肝炎に対する IFN 療法は、1986年の Hoofnagle ら¹⁾による pilot study 以来、その有効性が数多く報告されてきた。しかし、IFN の投与により治療終了時には血清 ALT 値の正常化と血中 HCV-RNA の陰性化を高率に認めるものの、経過観察中、約50%に血清 ALT 値の一過性あるいは持続的な上昇を認めることが知られている⁵⁻⁷⁾。

今回の検討においても、治療終了時には30例中20例 (66.7%) と高率に血清 ALT 値が正常値を示し、治療終了時の血中 HCV-RNA 陰性例も24例 (80%) と高率であった。しかし、多くの例で再燃を認め、治療後の血清 ALT 値の推移より著効と診断しえたのは8例 (26.7%) にすぎなかった。

萩原ら⁸⁾は C 型慢性肝炎患者を対象に IFN 療法を行い、その前後で血中 HCV-RNA を測定し、治療効果との関連について検討した。彼らは、18例中16例 (88.9%) において治療終了時の血中 HCV-RNA が陰

性化したものの、そのうち12例 (75%) に再燃を認めたことから、血中 HCV-RNA の変動様式からの治療終了後の経過予測には限界があったとし、PCR 法の感度の向上による検討とともに、ウイルス増殖の場である肝組織中における HCV-RNA の変動も検討する必要があることを報告した。

HCV が肝組織中で増殖していることは、肝組織中に HCV のプラス鎖 RNA のみでなく、増殖中間体とされるマイナス鎖 RNA も検出されることから確認されている¹²⁾。したがって、IFN 治療によりウイルス血症が消失しても、肝組織中に HCV が残存し、再燃に結びつく可能性が考えられ、血中のみでなく肝組織中 HCV-RNA の動態も検討することにより、IFN 療法の抗ウイルス効果をより詳細に解析できるものと思われる。

IFN 療法後の血中および肝組織中 HCV-RNA の検出率や治療効果との関連については、これまでいくつかの報告がなされてきたが、未だ一定の見解は得られていない。松本ら¹³⁾は14例の C 型慢性肝炎患者に 48~560MU の IFN 投与を行い、治療終了時の血中および肝組織中 HCV-RNA と治療終了後3ヵ月までの治療効果を検討した。彼らは、IFN 治療終了時の HCV-RNA 検出率は血中では14例中4例 (28.6%) であったが、肝組織中では14例すべてに検出されたと報告した。また、肝組織中 HCV-RNA と治療効果との関連については、治療終了時の肝組織中 HCV-RNA は治療効果にかかわらず全例に陽性であり、しかも治療終了時のウイルス量は有効例と無効例との間に有意差は認められず、両群とも著明に低下したため、治療後の ALT 値の推移を予測することはできなかったと報告した。一方、Balart ら¹⁴⁾は21例に α -IFN 療法を行ったところ、IFN 治療終了時の HCV-RNA 検出率は血中では21例中9例 (42.9%)、肝組織中では21例中6例 (28.6%) であり、肝組織中の検出率が血中より高率ではなかったと報告した。また、治療終了時の HCV-RNA と治療効果との関連を検討すると、complete response 群11例中、治療終了時に血中 HCV-RNA 陽性であったものは1例、肝組織中 HCV-RNA 陽性であったものは1例であり、partial response 群および no response 群の合計10例では血中で8例、肝組織中では5例にのみ HCV-RNA が陽性であった。したがって、血中のみならず、肝組織中 HCV-RNA まで検討しても、治療効果予測は困難であったと報告した。

今回の検討では、IFN 治療終了時の HCV-RNA 検

出率は血中では30例中6例(20%)、肝組織中では30例中11例(36.7%)であった。治療終了時の肝組織中におけるHCV-RNAの陽性率は血中より高かったが、有意差は認められなかった。今回の治療終了時の肝組織中HCV-RNA陽性率はBalartらの報告と近似するものの、松本らの報告とは大きく異なる。その理由として、松本らの報告においては、IFN総投与量が14例中8例において96MU以下と少量であったため、抗ウイルス効果が充分ではなく、治療終了時においても肝組織中HCV-RNA陰性化例が認められなかった可能性が考えられる。また今回、治療終了時のHCV-RNAと治療効果との関連では、著効例8例はすべて血中および肝組織中HCV-RNA陰性であったが、非著効例22例では治療終了時の血中HCV-RNA陽性が6例(27.3%)、肝組織中HCV-RNA陽性が11例(50%)であった。以上の結果より、著効を得るためにはIFN終了時に肝組織中HCV-RNAが陰性化する必要があると考えられたが、それでも充分とはいえず、Balartらの報告と同様に、治療終了時に肝組織中HCV-RNAが陰性となった例であっても再燃を多く認めた。したがって、今後はIFN療法例が著効を得るには、血中あるいは肝組織中HCV-RNAの陰性化を目標とするだけでなく、陰性化した時点よりさらに長期のIFN投与も考える必要があるものと思われた。

今回、治療終了時の血中HCV-RNAと肝組織中HCV-RNAの関連では、治療終了時に血中HCV-RNAが陰性となった24例中6例(25%)に肝組織中HCV-RNAが陽性であり、これら全例が経過観察中に血清ALT値の上昇を認めた。このような症例では、IFN治療によりウイルス血症が消失したものの、肝組織中にHCVが残存し、治療終了後に再燃を示したものと考えられた。しかし、血中のみでなく肝組織中もHCV-RNAが陰性化した18例であっても、10例(56%)に再燃を認めた。この理由として、(1)肝生検サンプルが極めて少量であること、(2)PCR法の感度が低いこと、(3)肝以外にHCVのリザーバーとなる場が存在すること、の3つの可能性が考えられる。肝組織中におけるHCV量は単位重量あたり血清の約100倍との報告¹⁵⁾もあり、より高感度に測定できることが期待されるものの、本論文では5mm長の検体(体積約4 μ l)の半量と、極めて少量より検出を行ったため、測定感度に影響を与えた可能性が考えられる。また肝生検組織が少量の場合には、サンプリングの場所によりサンプル中のHCV量に多寡が生じる可能性も考えられ

る¹⁴⁾。

PCR法の感度については、nested PCR法では1コピーのcDNAさえ検出可能であり高感度とされているが¹⁶⁾、cDNA合成までの段階、つまりRNA調整時のロスや逆転写反応の効率が問題となり測定感度が充分ではなかった可能性も考えられる⁵⁾。

肝以外のリザーバーについては、B型肝炎ウイルスDNAが血中や肝のみならずリンパ節・脾・生殖器・甲状腺・腎・膵・副腎等に証明されており¹⁷⁾、HCVにおいても肝以外に増殖を認める臓器や組織が存在する可能性も否定できないと思われる。また、近年HBVのみならずHCVも末梢血単核球(PBMC)に検出されるとの報告がされている^{18,19)}。

今後、IFN治療施行例の抗ウイルス効果をより詳細に解析するには、PBMCにおけるHCV-RNAと血中・肝組織中のHCV-RNAの関連やIFN治療効果との関連につき、さらに検討を要するものと思われる。また、これまでHCV感染肝細胞の検出にin situ hybridization法を用いた方法が検討されてきたが、PCR法の併用(PCR-in situ hybridization法)により、より高感度に検出できるとの報告²⁰⁾もある。今後はこのように新たな高感度検出法も検討されるべきであろうと思われる。

また、IFN治療終了時の肝組織中HCV-RNA陰性化例における著効の条件を明らかにするため、今回の検討において、IFN治療終了時に血中および肝組織中ともにHCV-RNAが陰性であった18例について、著効となった8例と再燃を認めた10例に分け、その臨床・ウイルス学的特徴を検討したが、明らかな差は見いだしなかった。今後はこうした両者陰性例のうちどのような症例が著効となり、どのような症例が再燃するのかを明らかにすることが治療効果予測上重要であり、IFN投与スケジュールを適宜変更することにより、より効率のよい治療を行える可能性も考えられる。

本研究により、IFN治療終了時に血中HCV-RNAが陰性となった例でも、その約1/4に肝組織中HCV-RNAが検出されることが明らかとなった。さらに、このような例では全例経過観察中に再燃を認め、著効となるには、治療終了時に血中のみでなく肝組織中のHCV-RNAも陰性化する必要があることが示された。しかし、血中および肝組織中HCV-RNAが両者陰性化してもなお効果予測には限界があり、約半数の例に再燃が認められた。今後はIFN治療例の抗ウイルス効果を正確に評価するうえで、より多くのウイルス学的

知見の集積が必要と考えられ、その成果によりC型慢性肝炎に対するIFN療法が、より効率よく行われることが期待される。

結 語

IFN療法を施行した30例のC型慢性肝炎症例を対象に治療前後で血中および肝組織中HCV-RNAを測定し、治療効果との関連について検討し、以下の結果を得た。

1) 治療前には、血中HCV-RNAは29例(96.7%)、肝組織中HCV-RNAは測定した14例すべてに陽性であった。治療終了時には、血中HCV-RNAは6例(20%)、肝組織中HCV-RNAは11例(36.7%)に検出され、肝組織中における陽性率が高かったものの有意差は認められなかった。

2) 治療前後で肝組織中HCV-RNA量を測定した13例では、12例にウイルス量の減少が認められ、IFNの抗ウイルス効果が示された。

3) IFN治療終了時、血中HCV-RNA陰性の24例中6例(25%)に肝組織中HCV-RNAが陽性であり、ウイルス血症消失後も肝組織中にHCVの残存する例が存在することが明らかとなった。これらの6例では経過観察中に全例再燃を認め、著効となるためには少なくとも肝組織中HCV-RNAまで陰性化する必要があるものと考えられた。

4) 治療終了時に血中・肝組織中ともにHCV-RNAが陰性の18例では著効は8例(44%)にすぎず、両者陰性例であっても再燃例を多く認めた。したがって、血中のみでなく肝組織中HCV-RNAまで測定しても、治療効果予測にはなお限界があるものと思われた。

謝辞：本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師小林健一教授に深甚の謝意を表します。また、直接の御指導ならびに御懇切なる御助言を下さいました鶴浦雅志講師、金子周一講師に深謝致します。および本研究に御協力下さいました金沢大学医学部第1内科第2研究室各位に感謝の意を表します。

この論文の要旨は、第29回日本肝臓学会総会(1993年、奈良)において発表した。

文 献

- 1) Hoofnagle JH, Mullen KM, Jones DB, et al: Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 315: 1575—1578, 1986
- 2) Thomson BJ, Doran M, Lever AML, et al: Alpha-interferon therapy for non-A,non-B hepatitis transmitted by gammaglobulin replacement therapy. *Lancet* 1: 539—541, 1987
- 3) Davis GL, Balart LA, Schiff EF, et al: Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alpha: A multicenter randomized controlled trial. *N Engl J Med* 321: 1501—1506, 1989
- 4) Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, et al: Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 321: 1506—1510, 1989
- 5) 萩原秀紀, 林 紀夫, 三田英治, 他: Interferon 治療時の血中C型肝炎ウイルスRNAの検討. *日消誌* 88(7): 1420—1425, 1991
- 6) Chayama K, Saitoh 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
- 7) 赤羽賢浩, 岡田俊一, 宮崎吉規, 他: 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(3): 243—249, 1991
- 8) 矢野右人, 八橋 弘, 井上長三, 他: DNAプローブ法による肝炎ウイルスのゲノム診断. *肝臓* 33(Suppl 1): 49, 1992
- 9) 金子周一, 三谷隆彦: 臨床ウイルスマーカーとしてのC型肝炎ウイルスRNA測定の可能性. *肝臓* 34(7): 579—581, 1993
- 10) Okamoto H, Sugiyama Y, Okuda 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
- 11) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156—159, 1987
- 12) Fong TL, Shindo M, Feinstone SM, et al: Detection of replicative intermediates of hepatitis C viral RNA in liver and serum of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Invest* 88: 1058—1060, 1991
- 13) 松本昌之, 藤森 功, 奥野忠雄, 他: C型慢性肝炎のインターフェロン治療による肝内および血中HCV RNAレベルの変化. *肝臓* 32(11): 983

- 989, 1991
- 14) Balart LA, Perrillo R, Roddenberry J, et al: Hepatitis C RNA in liver of chronic hepatitis C patients before and after interferon alfa treatment. *Gastroenterology* 104: 1472—1477, 1993
- 15) 八橋 弘, 矢野右人: HCV-RNA level と HCV genotype の臨床的有用性. *肝臓* 34(Suppl 1): 54, 1993
- 16) Garson JA, Tedder RS, Briggs M, et al: Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by “nested” polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 335: 1419—1422, 1990
- 17) Yoffe B, Burns DK, Bhatt HS, et al: Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology* 12: 187—192, 1990
- 18) Mueller HM, Pfaff E, Theilmann L: Detection of HCV RNA in lymphocytes derived from chronically infected patients using the polymerase chain reaction. *Hepatology*, 14: 67A, 1991
- 19) 柳 昌幸, 佐伯理恵子, 竹内正勇, 他: 患者末梢血リンパ球からの HCV-RNA の検出. *肝臓* 33(Suppl 2): 50, 1992
- 20) 河合博志, 金子周一, 中本安成, 他: Polymerase chain reaction in situ hybridization (PCR ISH) 法による HCV 感染肝細胞の検出. *肝臓* 34(Suppl 1): 228, 1993

Change of HCV-RNA in liver tissue and interferon responsiveness in patients with chronic hepatitis C

Masayu TAKEUCHI*

In order to clarify the relationship between the change of HCV-RNA in liver tissue and response to IFN therapy, HCV-RNA in sera and liver tissues of 30 patients with chronic hepatitis C were examined before and after IFN therapy. Before therapy, serum HCV-RNA were detected in 29 out of 30 (96.7%) patients, and liver tissues of all 14 patients examined were positive for HCV-RNA. At the end of IFN therapy, serum HCV-RNA was still positive in 6 (20%) patients and liver tissues of 11 (36.7%) patients contained HCV-RNA. Comparison of HCV-RNA levels in liver tissues of 13 patients before and after IFN therapy revealed that the viral titers decreased following therapy in all cases except one. As for the relationship between the change of HCV-RNA presence and the therapeutic effect, relapse was observed in all the patients who had been positive for HCV-RNA in liver tissue at the end of IFN therapy. Even among 18 patients who were negative for HCV-RNA in both serum and liver tissue, only 8 (44%) patients showed an excellent response to IFN therapy. These results indicate that the relapse is observed in all of those patients in whom HCV-RNA became negative in serum but was still positive in liver tissue at the end of therapy, and that there are also some cases who show relapse even after disappearance of HCV-RNA from liver tissue.

* First Department of Internal Medicine, Kanazawa University School of Medicine (Kanazawa)