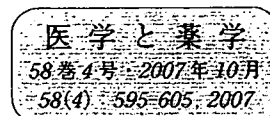


- lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2006; 130: 2039-49.
- 15 Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ *et al.* Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 902-11.
 - 16 Colonno RJ, Rose R, Pokornowski K *et al.* Assessment at three years shows barrier to resistance is maintained in entecavir-treated nucleoside-naïve patients while resistance emergence increases over time in lamivudine refractory patients. *Hepatology* 2007; 44: 229A (Abstract).
 - 17 Kanada A, Takehara T, Ohkawa K *et al.* Type B fulminant hepatitis is closely associated with a highly mutated hepatitis B virus strain. *Intervirology* 2007; 50: 394-401.
 - 18 McMahon MA, Jilek BL, Brennan TP *et al.* The HBV drug entecavir - Effects on HIV-1 replication and resistance. *N Engl J Med* 2007; 356: 2614-21.
 - 19 Benhamou Y, Thibault V, Vig P *et al.* Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients infected with lamivudine-resistant hepatitis B and HIV-1. *J Hepatol* 2006; 44: 62-7.
 - 20 Benhamou Y, Fleury H, Trimoulet P *et al.* TECOVIR Study Group. Anti-hepatitis B virus efficacy of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. *Hepatology* 2006; 43: 548-55.
 - 21 Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y *et al.* Selection of a virus strain resistant to entecavir in a nucleoside-naïve patient with hepatitis B of genotype H. *J Clin Virol* 2007; 39: 149-52.
 - 22 Ozasa A, Tanaka Y, Orito E *et al.* Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 44: 326-34.



HCV RNA 定量キット

コバス TaqMan HCV「オート」の検討

—TaqMan HCV「オート」に関する共同研究：中間報告—

熊田 博光¹⁾・豊田 成司²⁾・泉 並木³⁾
 岡上 武⁴⁾・伊藤 義人⁵⁾・加藤 道夫⁶⁾
 飯野 四郎⁷⁾

要 旨

リアルタイム PCR 法の一つである TaqMan PCR 法を増幅・検出原理とする HCV RNA 定量キット、コバス TaqMan HCV「オート」(以下、TaqMan HCV)に関する検討を行った。その結果、TaqMan HCV は、既存 HCV RNA 定量測定法と良好な相関を示し、治療ガイドラインで低/高ウイルス量の境界となる 5.0 Log IU/mL [100 K IU/mL] 付近ではほぼ 1 対 1 の相関を示したことにより、TaqMan HCV も同一の基準で判断してよいと考えられた。また、治療中のウイルス量推移パターンも既存 HCV RNA 定量測定法と近似する挙動を示し、さらに長期間の観察が可能であったことが確認され、治療中の経過観察に応用できると考えられた。一方、既存 HCV RNA 定性法と比較したところ、TaqMan HCV のほうが高感度であることが示され、TaqMan HCV で測定を行うことにより、再燃例を低減することが期待できると考えられた。

また、リバビリン併用 PEG-IFN α 2b 療法における治療効果予測について TaqMan HCV を用いて検討した結果、HCV dynamics の解析が有効であることが示唆された。

1) 虎の門病院肝臓センター 2) 札幌厚生病院消化器科 3) 武蔵野赤十字病院消化器科 4) 大阪府済生会吹田病院 5) 京都府立医科大学消化器内科学 6) 独立行政法人国立病院機構 大阪医療センター消化器科 7) 静山会 清川病院肝臓病センター

Evaluation of HCV RNA measurement kit COBAS[®] TaqMan[®] HCV [AUTO] — Cooperative study : Interim report

Hiromitsu Kumada *Department of Hepatology, Toranomon Hospital*

Joji Toyota *Division of Gastroenterology, Sapporo Kosei Hospital*

Namiki Izumi *Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital*

Takeshi Okanoue *Osaka Saiseikai Suita Hospital*

Yoshito Itoh *Molecular Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine*

Michio Kato *Department of Gastroenterology, National Hospital Organization, Osaka National Hospital*

Shiro Iino *Center for Liver Diseases, Seizankai Kiyokawa Hospital*

Key words : HCV RNA, アンプリコア, TaqMan, リアルタイム PCR

Table 1 採血ポイントと測定項目

採血ポイント	TaqMan HCV 「オート」	アンプリコア 定量	アンプリコア 定性
1. 投与前 [開始前2週以内] (Pre)	○	○	×
2. 投与開始3日目 (3D)	○	○	▲
3. 投与開始7日目 (7D)	○	○	▲
4. 投与開始2週目 (2W)	○	○	▲
5. 投与開始4週目 (4W)	○	○	▲
6. 投与開始8週目 (8W)	○	△	○
7. 投与開始12週目 (12W)	○	△	○
8. 投与開始24週目 (24W)	○	△	○
9. 投与開始48週目 (48W)*	○	△	○
10. 投与終了後6カ月目 (FU 6M)	○	△	○

○：必ず測定

×：測定せず

▲：アンプリコア定量 測定下限未満の際に測定

△：アンプリコア定性 陽性の際に測定

*：Gt 2a/2b グループにおいては原則測定せず

はじめに

近年、C型慢性肝炎の原因治療としてリバビリン併用 PEG-IFN 療法が第一選択となり、genotype 1b かつ高ウイルス量症例に対するウイルス駆除率が格段に向上した。その中で HCV RNA 測定は、最適な治療方針や治療期間の決定・変更を判断するマーカーの一つとして、投与前の治療法の選択や投与中の治療効果モニタリングなどの場面で汎用されている¹⁾。

しかしながら、これまでの HCV RNA 測定法は検出感度や測定範囲の面で必ずしも臨床側の要望を十分に満たすものではなく、単位や報告値表現が異なる複数の定量測定法の使い分けを必要としたり、定量測定と定性測定を重複して用いなければならない場合があるなど不便を感じることも少なくない。また、投与終了後に再燃する ETR (end of treatment response) 症例を減らし SVR (sustained virological response) 率を向上させるためには、既存の HCV RNA 定性測定よりもさらに高感度な測定系の

登場が待たれるところである。

このような背景から、われわれは、高い検出感度と広い測定範囲を両立する新しい検査法コバス TaqMan HCV「オート」²⁾³⁾ (ロシュ・ダイアグノスティックス、東京)の基礎的性能を明らかにするとともに臨床的有用性を確認することを目的に、多施設共同による prospective study 形式で臨床評価を開始したので、今回その中間成績を報告する。

I. 対象および方法

1. 対象

平成 18 年 10 月より平成 19 年 4 月までの間に札幌厚生病院、清川病院、武蔵野赤十字病院、虎の門病院、京都府立医科大学病院、独立行政法人国立病院機構 大阪医療センターにて、リバビリン併用 PEG-IFN α 2b 療法を新規導入する高ウイルス量 (投与前 HCV RNA 量 100 K IU/mL 以上) の C 型慢性肝炎患者を対象とし、インフォームドコンセントを得られた 93 名について、Table 1 に設定されたポイントで採血

Table 2 測定結果の状態により4種の報告パターンがある。測定下限未満 (<1.2 Log IU/mL) となった場合でも、HCV RNA の検出を意味する“HCV 増幅反応シグナル”を検出した場合と検出しなかった場合に区別されて報告される。

	[結果報告例 ①]	[結果報告例 ②]	
	結 果	結 果	HCV 増幅 反応シグナル
測定範囲の上限を超えた場合	>7.8 Log IU/mL [>6.9×10 ⁷ IU/mL]	>7.8 Log IU/mL [>6.9×10 ⁷ IU/mL]	検 出
測定範囲内で結果を得た場合	X.X Log IU/mL [X.X×10 ⁿ IU/mL]	X.X Log IU/mL [X.X×10 ⁿ IU/mL]	検 出
測定範囲の下限未満であるが HCV 増幅反応シグナルは検 出した場合	<1.2 Log IU/mL [<15 IU/mL]	<1.2 Log IU/mL [<15 IU/mL]	検 出
HCV 増幅反応シグナルを検 出しなかった場合	検出せず	<1.2 Log IU/mL [<15 IU/mL]	検出せず

を行った。採血には血清用真空採血管を用い、採血後6時間以内に遠心分離を行い、測定までの間は-80℃にて凍結保存した。

2. TaqMan HCV 測定法

(リアルタイム PCR 法)⁴⁾

測定試薬はコバス TaqMan HCV「オート」を用い、核酸抽出工程は検体前処理装置コバス AmpliPrep、核酸増幅・検出工程は遺伝子解析装置コバス TaqMan、さらに両機を連結するドッキングステーションを用いて、添付文書および操作説明書に従って核酸抽出から増幅・検出まですべての工程を全自動で行った²⁾。測定には1.0 mLの血清を用いる。測定はロシュ・ダイアグノスティックス（東京）で実施した。なお、本法では、結果が測定下限未満となった際、定量値は得られないがHCV RNAを検出している場合は“<1.2 Log IU/mL [<15 IU/mL] 【検出】”，また、HCV RNAが検出されない場合は、【検出せず】と報告される（Table 2）。本法の測定範囲は1.2~7.8 Log IU/mL [15~6.9×10⁷ IU/mL] である。

3. 既存 HCV RNA 測定法

1) アンプリコア HCV 定量法

アンプリコア GT HCV モニター v2.0⁵⁾（以下、アンプリコア定量：ロシュ・ダイアグノスティックス，東京）を用い、エスアールエル（東京）にて委託測定を行った。測定には300 μLの血清を用いるオリジナル法と生食で血清を10倍希釈した試料を300 μLを用いるハイレンジ法⁶⁾を併用し、ハイレンジ法の測定結果が測定下限未満であった場合にオリジナル法の測定結果を採用して集計を行った。それぞれの測定範囲は、ハイレンジ法：3.7~6.7 Log IU/mL [5 K~5,000 K IU/mL]，オリジナル法：2.7~5.7 Log IU/mL [0.5 K~500 K IU/mL] である。

2) アンプリコア HCV 定性法

核酸抽出試薬であるアンプリキャップ GT HCV v2.0 とアンプリコア HCV v2.0⁷⁾（以下、アンプリコア定性：ロシュ・ダイアグノスティックス，東京）を用い、エスアールエル（東京）にて委託測定を行った。測定には350 μLの血清を用いる。本組み合わせによる検出感度は1.7 Log IU/mL [50 IU/mL] である。

Table 3 投与前患者背景をウイルス陰性化時期別に比較。性別・genotypeは χ^2 検定，他はすべてt検定を実施した（項目によって測定されていない症例もあるため，n数に満たない場合もあり）。

	全体 (n=93)	4W (n=82)			12W (n=70)			24W (n=22)		
	(平均)	RVR (平均)	non RVR (平均)	<i>p</i>	EVR (平均)	non EVR (平均)	<i>p</i>	LVR (平均)	non LVR (平均)	<i>p</i>
性別 [男/女]	[48/45]	[5/4]	[36/37]	NS	[16/19]	[17/18]	NS	[3/7]	[6/6]	NS
年齢 (歳)	55.5	53.8	55.2	NS	52.3	58.7	NS	57.3	59.1	NS
体重 (kg)	59.1	56.5	59.6	NS	59.6	58.9	NS	55.2	58.6	NS
Genotype [1/2]	[75/18]	[1/8]	[63/10]	<0.001	[28/7]	[32/3]	NS	[10/0]	[12/0]	検定不可
AST (IU/L)	61	55	59	NS	58	61	NS	74	75	NS
ALT (IU/L)	75	84	73	NS	78	68	NS	75	88	NS
γ -GTP (IU/L)	58	37	59	NS	65	47	NS	46	55	NS
T-Bil (mg/dL)	0.8	0.7	0.8	NS	0.7	0.8	NS	0.7	0.9	NS
Alb (g/dL)	3.9	4.1	3.9	NS	4.0	3.8	NS	3.7	3.9	NS
T-Cho (mg/dL)	170	167	171	NS	176	166	NS	158	157	NS
WBC (/ μ L)	4,658	4,678	4,656	NS	4,797	4,489	NS	4,580	4,317	NS
好中球 (/ μ L)	2,357	2,462	2,358	NS	2,704	2,282	NS	2,038	1,939	NS
Hb (g/dL)	14.2	14.1	14.2	NS	14.3	14.0	NS	13.3	14.3	NS
Plt ($\times 10^4$ / μ L)	19.3	19.3	16.6	NS	18.2	15.2	NS	16.3	12.8	NS

4. 集計および統計処理

対象患者の genotype (serogroup) の内訳は、

① genotype 1a : 1 症例，② genotype 1b : 61 症例，③ genotype 1b+3a : 1 症例，④ serogroup 1 : 12 症例，⑤ genotype 2a : 9 症例，⑥ genotype 2b : 8 症例，⑦ serogroup 2 : 1 症例であり，①～④を Gt 1a/1b グループ，⑤～⑦を Gt 2a/2b グループとして集計を行った。

また，TaqMan HCV による測定にて投与前開始 4 週目までに【検出せず】となった群を「rapid viral response (以下，RVR)」，【検出せず】とならなかった群を「non RVR」とし，以下同様にて 5 週目から 12 週目までに【検出せず】となった群を「early viral response (以下，EVR)」，【検出せず】とならなかった群を「non EVR」に，また 13 週目から 24 週目までに【検出せず】となった群を「late viral response (以下，LVR)」，【検出せず】とならなかった群を「non LVR」に

それぞれ群別して genotype グループごとに集計を行った。これら各群についての投与前背景因子を Table 3 に示す。

なお，測定値の比較にはピアソンの相関係数の検定を，各群の有意差検定においては，性別および genotype は χ^2 検定，他はすべて t 検定を用いた。

II. 成績

1. アンプリコア定量との相関

症例登録された 93 症例において，各採血ポイントにてアンプリコア定量（ハイレンジ法またはオリジナル法）が測定された血清 558 例を用い，TaqMan HCV とアンプリコア定量がともに測定範囲内を示した 460 例において，相関係数は $r=0.973$ ，回帰式は $y=1.11x-0.36$ と良好な相関性を示した。また，Gt 1a/1b グループと Gt 2a/2b グループで TaqMan HCV とア

- ▲: アンプリコア定量で測定上限を超えたもの
- ◆: 両測定法とも定量範囲内だったもの
- : アンプリコア定量で測定下限未満であったもの
- ※ アンプリコア定量可能域で TaqMan HCV 「オート」で測定範囲外の例はなし

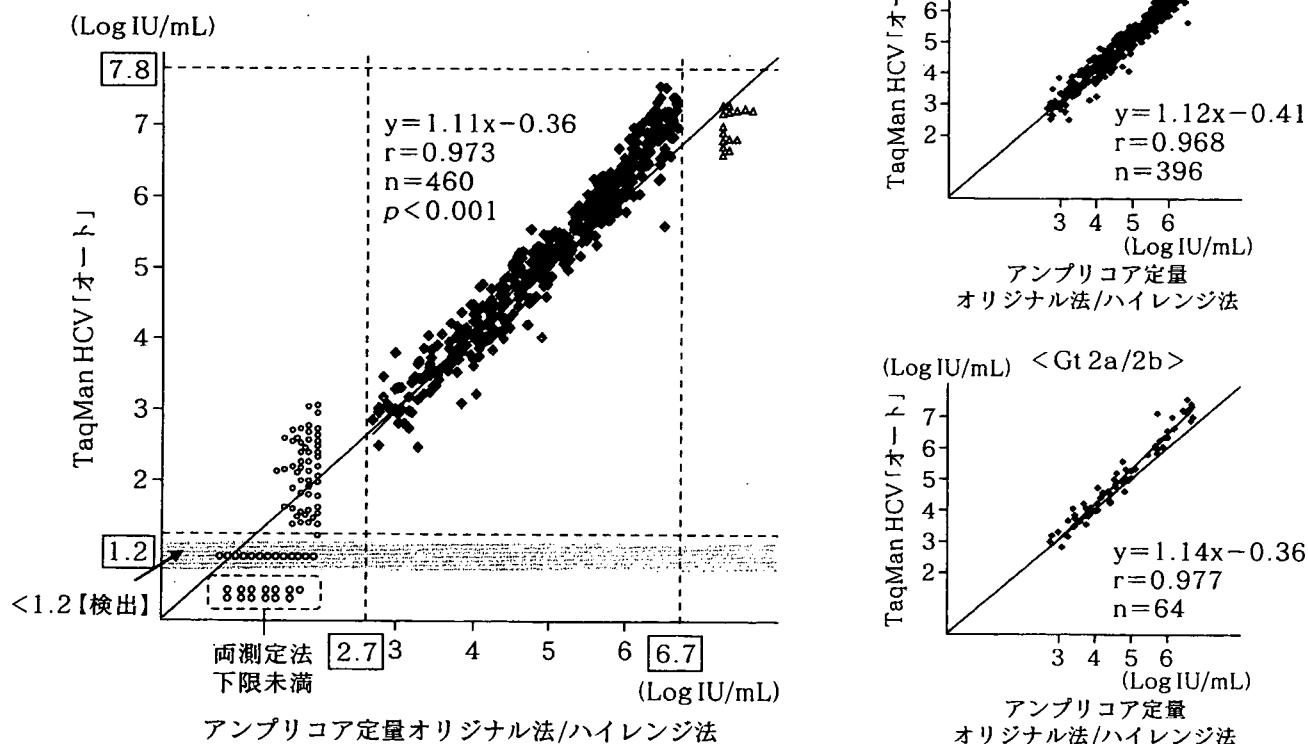


Fig. 1 Gt 1a/1b グループ, Gt 2a/2b グループの患者血清 558 例を用いた TaqMan HCV とアンプリコア定量ハイレンジ法/オリジナル法 (左) および genotype ごとに区別した場合 (右) の比較。破線は各測定法の測定範囲の上・下限を表す。なおアンプリコア定量のデータは、ハイレンジ法の測定結果が測定下限未満であった場合にオリジナル法の測定結果を採用し、集計した。

アンプリコア定量の相関性をそれぞれ検討したところ、Gt 1a/1b グループ 396 例における相関係数は $r=0.968$ 、回帰式は $y=1.12x-0.41$ 、Gt 2a/2b グループ 64 例における相関係数は $r=0.977$ 、回帰式は $y=1.14x-0.36$ であった。なお、アンプリコア定量 (ハイレンジ法) で測定上限を超えた 15 例はすべて TaqMan HCV では定量値を得られ、またアンプリコア定量 (オリジナル法) で測定下限未満であった 83 例中 69 例が TaqMan HCV で検出された。そのうち 56 例は TaqMan HCV で定量値を得られた (Fig. 1)。

2. アンプリコア定性との比較

症例登録された 93 症例においてアンプリコア定性が測定された 299 例中、TaqMan HCV

で“測定可能”または“ $<1.2 \text{ Log IU/mL}$ 【検出】”, アンプリコア定性で“陽性”と判定されたものが 163 例, TaqMan HCV で【検出せず】, アンプリコア定性で“陰性”と判定されたものが 105 例となり、一致率は 89.6% であった。乖離した 31 例中 28 例は TaqMan HCV で“測定可能”または“ $<1.2 \text{ Log IU/mL}$ 【検出】”, アンプリコア定性で“陰性”であり、アンプリコア定性に比し TaqMan HCV が高感度であることが確認された (Table 4)。

3. 投与前ウイルス量と RVR, EVR, LVR 達成との関係

治療中止例および投与前検体の欠損例を除く 81 症例を対象とし、TaqMan HCV およびアンプリコア定量の投与前ウイルス量と RVR,

Table 4 (A) 患者血清 299 例における TaqMan HCV とアンプリコア定性との比較。一致率は 89.6% (268/299)。乖離例 31 例中, 28 例 (90%) において TaqMan HCV で検出, アンプリコア定性で陰性であった。また, そのうち次の採血ポイントで測定結果を得ているのは 26 例であるが, 25 例は次の採血ポイントで TaqMan HCV : 検出せず, アンプリコア定性 : 陰性と一致したが, 1 例は TaqMan HCV : 測定または検出, アンプリコア定性 : 陽性であった。
(B) 投与開始から 4W, 8W, 12W, 24W 時点における TaqMan HCV とアンプリコア定性測定結果の比較。いずれの時期においても TaqMan HCV のほうがアンプリコア定性より感度良く HCV RNA が検出された。

(n=299)		TaqMan HCV「オート」 (測定下限 : 15 IU/mL)	
		測定または検出	検出せず
アンプリコア 定性	(+) (50 IU/mL 以上)	163	3 ^{*1}
	(-) (50 IU/mL 未満)	28 ^{*2}	105

4W (n=48)		TaqMan HCV「オート」 (検出率 : 81%)		8W (n=91)		TaqMan HCV「オート」 (検出率 : 75%)	
		検 出 ^{*3}	検出せず			検 出 ^{*3}	検出せず
アンプリコア 定性 (検出率 : 69%)	(+)	33	0	アンプリコア 定性 (検出率 : 64%)	(+)	57	1
	(-)	6	9		(-)	11	22
12W (n=84)		TaqMan HCV「オート」 (検出率 : 46%)		24W (n=40)		TaqMan HCV「オート」 (検出率 : 25%)	
		検 出 ^{*3}	検出せず			検 出 ^{*3}	検出せず
アンプリコア 定性 (検出率 : 43%)	(+)	35	1	アンプリコア 定性 (検出率 : 18%)	(+)	7	0
	(-)	4	44		(-)	3	30

*1 : Gt 1a/1b : 3 例

*2 : Gt 1a/1b : 18 例, Gt 2a/2b : 10 例

*3 : 測定値が得られたものも含む。

EVR, LVR 達成との関係について genotype ごとに検討を行った。その結果, 投与前ウイルス量は Gt 2a/2b グループの RVR 達成にのみ両測定法で有意差を認めたが, その他 EVR や LVR の達成には関与しないことが確認された (Fig. 2)。

4. 平均ウイルス量推移の比較

治療中止例を除く 82 症例を対象とし, 「RVR vs non RVR」, 「EVR vs non EVR」, 「LVR vs non LVR」の 3 パターンにて, それぞれの採血

ポイントでの平均ウイルス量の推移を genotype ごとに TaqMan HCV とアンプリコア定量で比較を行った。その結果, 各 Gt 1a/1b グループおよび Gt 2a/2b グループともに, TaqMan HCV はアンプリコア定量と近似する推移パターンを示すことが確認された (Fig. 3)。

5. HCV dynamics と RVR, EVR, LVR 達成との関係

治療中止例を除く 82 症例を対象とし,

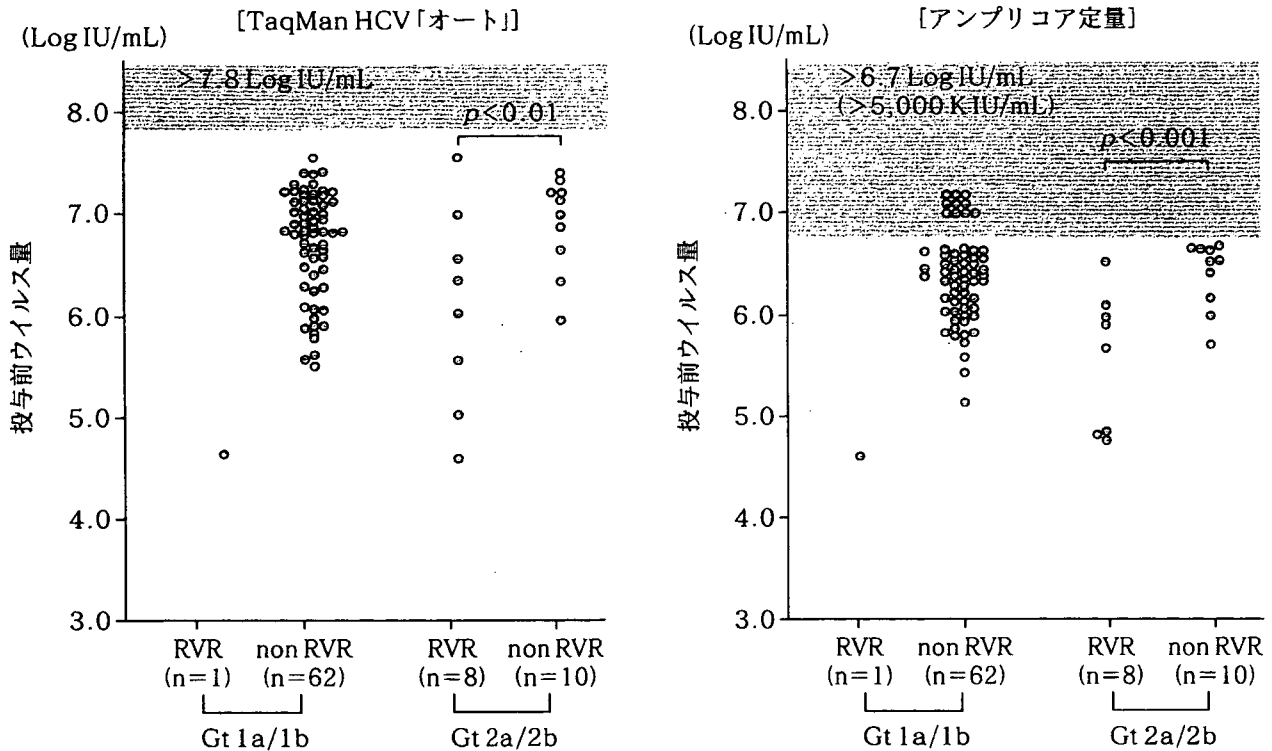


Fig. 2 81 症例を対象とし、「RVR vs non RVR」, 「EVR vs non EVR」, 「LVR vs non LVR」の3つの集計グループに分け、各群の投与前ウイルス量分布をそれぞれ TaqMan HCV とアンプリコア定量ハイレンジ法/オリジナル法にて比較したが、Gt 2a/2b グループの RVR 達成以外に有意差は認められなかった。Gt 1a/1b グループの EVR 達成は1症例のため、検定不可。網掛けの箇所は各測定法の測定上限を超えている領域であることを表す。

TaqMan HCV における投与前および投与前開始初期4週目までの2点間ウイルス減衰量、計9パターン (Pre-3D, Pre-7D, Pre-2W, Pre-4W, 3D-2W, 3D-4W, 7D-2W, 7D-4W, 2W-4W) と RVR, EVR, LVR 達成との関係について genotype ごとに検討を行った。その結果、Gt 1a/1b グループの EVR 達成において、9パターンすべてで有意差が認められた (Table 5)。

III. 考 察

高感度かつ広範囲な測定レンジを有する TaqMan HCV が上市されることにより、市場では既存 HCV RNA 測定法 (定量および定性) からの切替が促進されることが予測される。このことを鑑み、われわれは TaqMan HCV の基礎的性能および臨床的有用性を明らかにすることを目的に、リバビリン併用 PEG-IFN α 2b 療

法症例を対象とした TaqMan HCV の臨床評価を多施設共同による prospective study 形式で実施している。今回は、既存測定法であるアンプリコア定量および定性との比較について、また、TaqMan HCV における投与前開始~4週目、5~12週目、13~24週目での HCV RNA 消失と、投与前ウイルス量および HCV dynamics⁸⁾ との関連について報告を行った。

アンプリコア定量との相関性の検討においては、測定値が大きく乖離する例は認めず、また genotype グループ間での相関分布にも偏在はなく、極めて良好な相関性を示すことを確認した。データの互換性については、狩野らの報告²⁾と同様に 6.0 Log IU/mL [1,000 K IU/mL] 付近を越えたあたりから TaqMan HCV のほうが若干高値を示すことを確認したが、この傾向はアンプリコア定量の頭打ち現象に原因するものと推定される。一方、本邦の治療ガイドライ

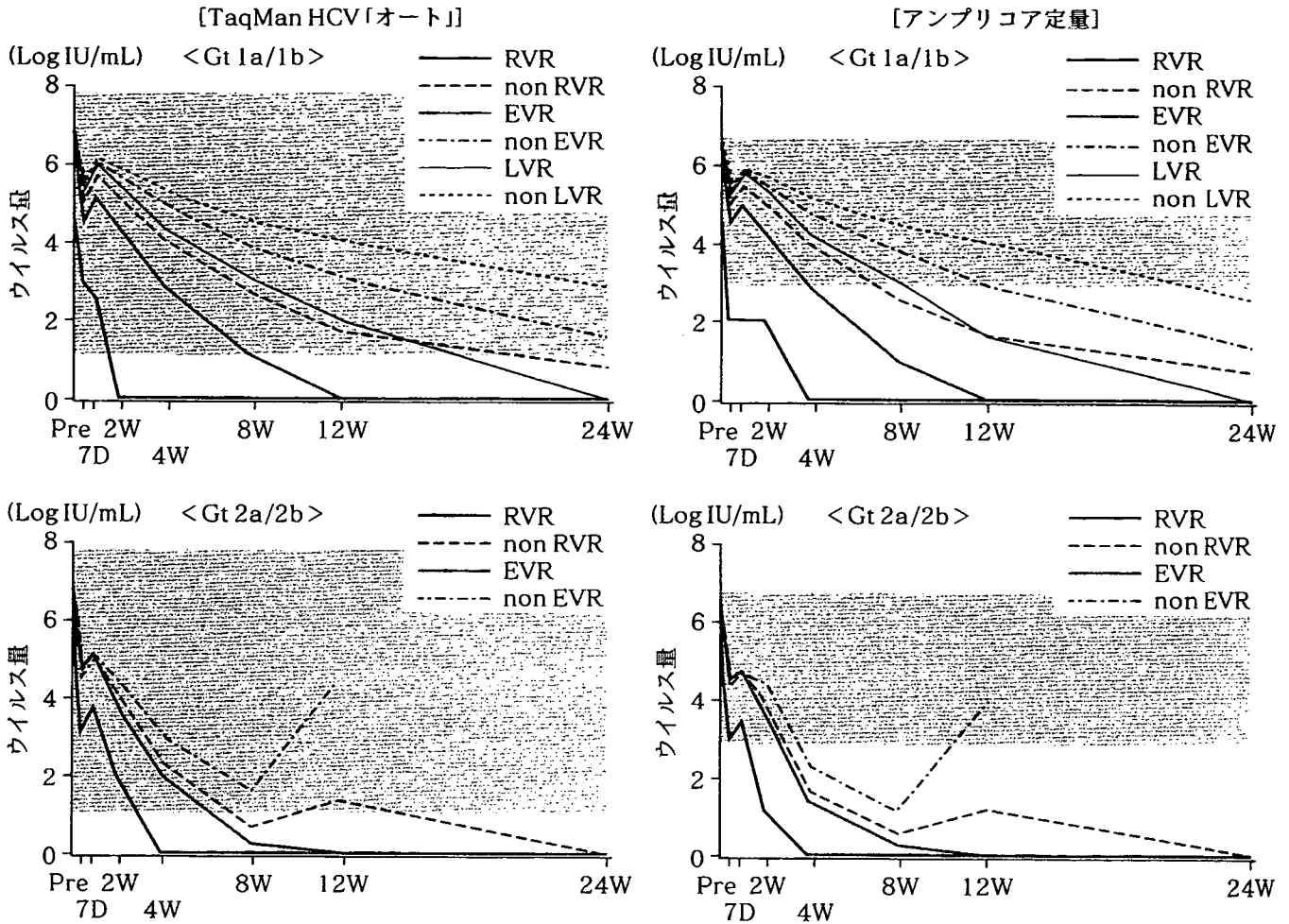


Fig. 3 82症例を対象とし、「RVR vs non RVR」, 「EVR vs non EVR」, 「LVR vs non LVR」の3グループに分け、それぞれの平均ウイルス量の推移をTaqMan HCVとアンプリコア定量ハイレンジ法/オリジナル法にて比較した。網掛けの箇所は各測定法の定量測定可能領域であることを表す。各測定法の測定下限未満については、TaqMan HCVで1.2 Log IU/mL [0.015 K IU/mL] 未満で検出したものは1 Log IU/mL [0.01 K IU/mL], 検出せずとなったものは0 IU/mL, アンプリコア定量で2.7 Log [0.5 K] IU/mL 未満でアンプリコア定性で陽性と判定されたものは2 Log IU/mL [0.1 K IU/mL], 陰性判定されたものは0 IU/mLとして集計した。

ン⁹⁾で低/高ウイルス量の境界となる5.0 Log IU/mL [100 K IU/mL] 付近ではほぼ1対1の相関を示したことより、TaqMan HCVの測定値も同一の基準で判断してよいと考えられた。また、リバビリン併用PEG-IFN α 2b投与期間中のTaqMan HCVのウイルス量測定は、アンプリコア定量と近似する推移パターンを示したことより、治療中の経過観察にも応用できることが確認された。なお、およそ10⁶幅のHCV RNA量モニタリングが可能なTaqMan HCVは、ハイレンジ法とオリジナル法の組み合わせ

により10⁴幅のモニタリングが可能となるアンプリコア定量と比較して、より長期間にわたりウイルス量変動を観察することが可能であった。

アンプリコア定性との一致率は89.6% (268/299)であり、乖離例が31例存在した。そのうち、次の採血ポイントの測定結果が明らかになっている26例中25例は次採血ポイントにおいて、TaqMan HCVで【検出せず】、アンプリコア定性で“陰性”と測定結果の一致をみていることから、抗ウイルス治療により血中ウイル

Table 5 82症例を対象とし、「RVR vs non RVR」, 「EVR vs non EVR」, 「LVR vs non LVR」の3グループに分け、2点の採血ポイント間（計9カ所）におけるウイルス減衰量をTaqMan HCVにて比較。Gt 1a/1bグループではすべての採血ポイント間において、EVRを得られたグループが得られなかったグループと比較して、有意にウイルス減衰量が多かった。

Δウイルス量	Gt 1a/1b			Gt 2a/2b		
	RVR	EVR	LVR	RVR	EVR	LVR
Pre-3D	検定不可	$p < 0.05$	NS	NS	NS	検定不可
Pre-7D		$p < 0.05$	NS	NS	NS	
Pre-2W		$p < 0.05$	NS	NS	NS	
Pre-4W		$p < 0.05$	NS	—	NS	
3D-2W	検定不可	$p < 0.001$	NS	NS	NS	検定不可
3D-4W		$p < 0.01$	$p < 0.05$	—	NS	
7D-2W	検定不可	$p < 0.05$	NS	NS	NS	検定不可
7D-4W		$p < 0.05$	NS	—	NS	
2W-4W	—	$p < 0.05$	NS	—	NS	—

量が消失していく過程で各測定法の検出限界（TaqMan HCV : 1.2 Log IU/mL [15 IU/mL], アンプリコア定性 : 1.7 Log IU/mL [50 IU/mL]）に差し掛かった際に発生する乖離であると推測された。これら乖離例中9割強に相当する28例において、TaqMan HCVで【検出】、アンプリコア定性で“陰性”の結果を得ており、TaqMan HCVがより高感度にHCV RNAを検出することが確認された。Table 4に示すように、すべての採血ポイントにおいてTaqMan HCVの検出率がアンプリコア定性を上回る結果となったが、特に投与開始4週目と8週目でその傾向は顕著であった。Genotype 1b高ウイルス量に対する治療ガイドラインでは、投与開始12週目および24週目のHCV RNA定性の消長が治療方針を決定するcritical pointとなっているが、アンプリコア定性よりも高感度にHCV RNAを検出するTaqMan HCVで測定を行った場合、再燃例の低下が期待できるだろう。小林らは、投与終了時点でアンプリコア定性が陰性で投与終了後HCV RNAの再陽性化を認めた症例のうち、約10%でTaqMan HCVにて投与終了時HCV RNA陽性と判定さ

れたと報告している¹⁰⁾。よりの確な治療方針の選択にあたり、高感度となったTaqMan HCVをどのように利用していくかが今後の課題である。

リバビリン併用PEG-IFN α 2b療法における治療効果予測について、投与開始～4週目、5～12週目、13～24週目でHCV RNAが消失するか否かの観点で、TaqMan HCVを用いて投与前ウイルス量の測定とHCV dynamicsの検討を行った。投与前ウイルス量は、IFN単剤療法においては治療効果を規定する独立した因子とされてきたが、genotype 1bかつ高ウイルス量を対象としたリバビリン併用IFN療法においては、治療効果と有意な相関を示さないとする報告が多い¹¹⁾¹²⁾。今回、優れた直線性を有するTaqMan HCVを用いて改めて検証を行ったが、投与前ウイルス量はGt 2a/2bグループにおけるRVR群（4週目のHCV RNA消失）の予測に有意差を認めたのみで、EVR（12週目のHCV RNA消失）群やLVR（24週目のHCV RNA消失）群では有意差を認めなかった。一方、投与開始前および投与開始4週目までの2点間ウイルス減衰量を検討したHCV dynamic

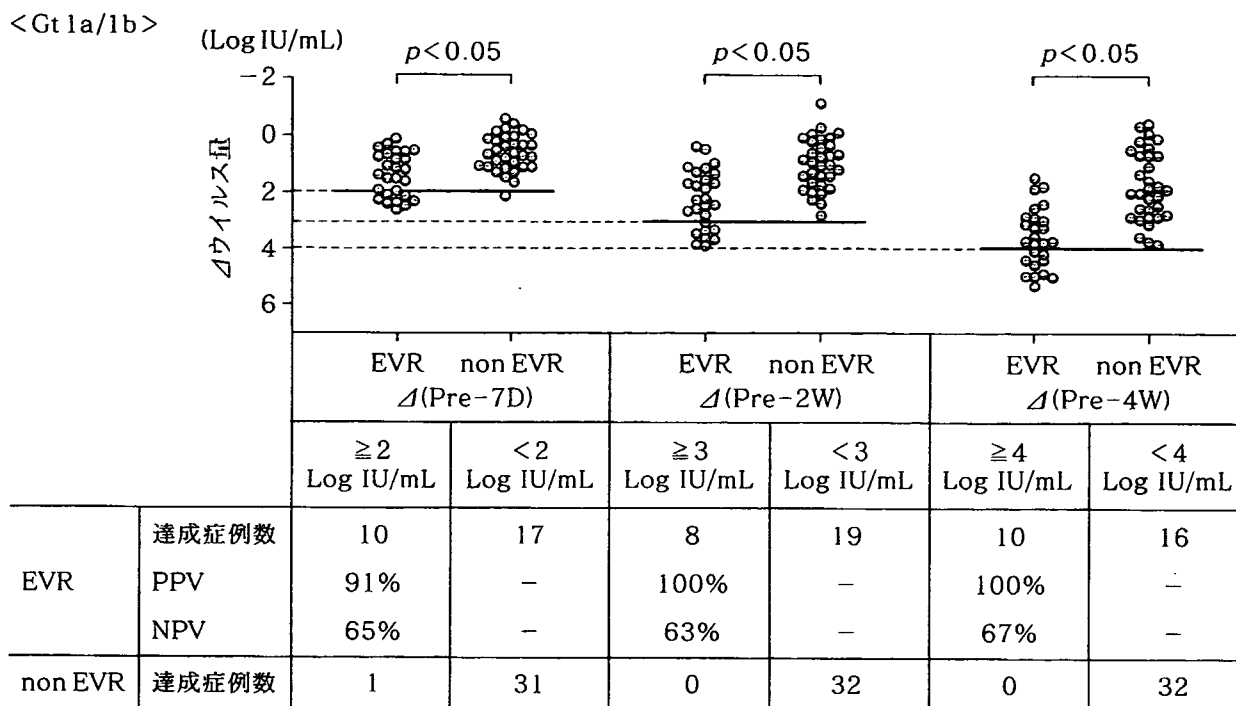


Fig. 4 2点の採血ポイント間のウイルス減衰量検討のうち、EVR予測の指標となり得る3カ所の抜粋および positive predict value (PPV) と negative predict value (NPV) の評価。特異度を高める設定で検討したところ、Gt 1a/1b グループにおいて、ウイルス減衰量が投与開始より7日経過時に2 Log IU/mL以上、2週経過時に3 Log IU/mL以上、4週経過時に4 Log IU/mL以上低下すると高いPPVが得られた。

解析では、Gt 1a/1b グループの EVR 群予測においてすべての集計ポイント間 (Pre-3D, Pre-7D, Pre-2W, Pre-4W, 3D-2W, 3D-4W, 7D-2W, 7D-4W, 2W-4W) で有意差を認める結果を得た。なかでも Pre-7D 間, Pre-2W 間, Pre-4W 間で、それぞれ 2 Log, 3 Log, 4 Log IU/mL 以上減衰することにより、12 週目の HCV RNA 消失に対する高い positive predict value (PPV) が得られることが確認された (Fig. 4)。リバビリン併用 PEG-IFN α 2b 療法における治療効果予測手段として、HCV dynamics の解析が有効であることが今回の検討で明らかになった。HCV dynamics の解析は、測定範囲が限られたアンプリコア定量では不向きといえ、日常臨床で応用される機会も少なかったが、今後、投与期間中の治療方針の検討に際して、TaqMan HCV を用いた HCV dynamics 解析が有用な情報として応用されることが期待される。

最後に TaqMan HCV の運用について触れる。まず測定値の報告形態であるが、TaqMan HCV は、HCV RNA 量を 10^1 台から 10^7 台まで広範囲に測定できるようになったことより、HBV DNA 量の測定と同様に対数 (Log IU/mL) で報告することが望まれる。その結果、実数値報告で問題となるであろう桁数の判読ミス avoid ことができ、測定値の判読性は向上する。また、HCV dynamics 解析が容易となることも対数報告では期待できる。続いて検体量の問題であるが、患者負担を考えると1回の測定に1.0 mL の検体を使用する点については今後の改善が望まれるところである。

結 語

1) TaqMan HCV は、アンプリコア定量 (ハイレンジ法/オリジナル法) と良好な相関を示し、治療中のウイルス量測定においても近似するウイルス量推移パターンを示した。また、検

出感度においてもアンプリコア定性より高感度であることが確認できたことより、既存のアンプリコア定量とアンプリコア定性に替わる検査法として日常臨床で利用可能であるといえる。

2) TaqMan HCV は、治療ガイドラインで低/高ウイルス量の境界となる 5.0 Log IU/mL [100 K IU/mL] 付近にてほぼ 1 対 1 の相関を示したことにより、TaqMan HCV も同一の基準で判断してよいと考えられた。

3) リバビリン併用 PEG-IFN α 2b 投与開始後の治療効果予測において、TaqMan HCV による HCV dynamics 解析の有用性が示唆された。

文 献

- 1) 泉 並木：ここがポイント C 型・B 型肝炎. 肝癌の診療, pp13-26, 南江堂, 東京, 2004.
- 2) 狩野吉康, 赤池 淳, 山崎 克 他：HCV RNA 測定試薬コバス TaqMan HCV 「オート」および HBV DNA 測定試薬コバス TaqMan HBV 「オート」における既存測定法との比較検討. 医学と薬学 58(1) : 137-149, 2007.
- 3) Sizmann D, Boeck C, Boelter J et al : Fully automated quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in human plasma and human serum by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan System. J Clin Virol 38 : 326-333, 2007.
- 4) Heid CA, Stevens J, Livak JK et al : Real time quantitative PCR. Genome Research 6 : 986-994, 1996.
- 5) Chayama K, Suzuki F, Tsubota A et al : Evaluation of quantitative measurements of hepatitis C virus RNA to predict sustained response to interferon by genotype. J Virol Methods 95 : 33-45, 2001.
- 6) 坪田昭人, 荒瀬康司, 小林万利子 他 : 高 HCV 量 C 型慢性肝炎に対応した高濃度領域測定用アンプリコア HCV モニター v2.0 (ハイレンジ法) の検討. 肝臓 45 : 223, 2004.
- 7) Wolfe L, Tamatsukuri S, Sayada C et al : Detection of HCV RNA in serum using a single-tube, single enzyme PCR in combination with a colorimetric microwell assay. Hepatitis C virus, pp83-94, GEMHEP, 1994.
- 8) Neumann AU, Lam NP, Dahari H et al : Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. Science 282 : 103-107, 1998.
- 9) 熊田博光 : B 型及び C 型肝炎ウイルスの感染者に対する臨床的研究. 厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野) 総括研究報告書, ppl-13, 2007.
- 10) 小林万利子, 鈴木文孝, 芥田憲夫 他 : C 型慢性肝炎インターフェロン・リバビリン併用療法後再燃例の再評価 : 高感度 HCV RNA 検出系 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test を用いて. 肝臓 48 : 382-383, 2007.
- 11) 藤野達也, 後藤和人, 有村英一郎 他 : C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN α 2b+ribavirin 併用療法における早期治療効果予測—血中 HCV 抗原によるモニタリング解析—. 肝臓 47 : 355-356, 2006.
- 12) 釈迦堂敏, 田中 崇, 猪俣慎二郎 他 : C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロン, リバビリン併用療法 24 週時の血清 HCV RNA 陰性予測におけるコア抗原の有用性. 肝臓 47 : 411-412, 2006.

* * *

Original Article

Early decline of hemoglobin can predict progression of hemolytic anemia during pegylated interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C

Naoki Hiramatsu,¹ Nao Kurashige,¹ Tsugiko Oze,¹ Tetsuo Takehara,¹ Shinji Tamura,¹ Akinori Kasahara,¹ Masahide Oshita,² Kazuhiro Katayama,³ Harumasa Yoshihara,⁴ Yasuharu Imai,⁵ Michio Kato,⁶ Sumio Kawata,⁷ Hirohito Tsubouchi,⁸ Hiromitsu Kumada,⁹ Takeshi Okanoue,¹⁰ Shinichi Kakumu¹¹ and Norio Hayashi¹

¹Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, ²Osaka Police Hospital, Osaka, ³Osaka Kouseinenkin Hospital, Osaka, ⁴Osaka Rousai Hospital, Sakai, ⁵Ikeda Municipal Hospital, Ikeda, ⁶National Hospital Organization Osaka National Hospital, Osaka, ⁷Department of Gastroenterology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, ⁸Department of Digestive and Lifestyle Related Disease, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, ⁹Toranomon Hospital, Tokyo, ¹⁰Molecular Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto and ¹¹Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Aichi Medical University School of Medicine, Aichi, Japan

Aim: Ribavirin, used to treat chronic hepatitis C, can induce hemolytic anemia, forcing the discontinuance of treatment. To establish a predictive measure to help circumvent this, we evaluated the relationship of hemoglobin (Hb) decline with the discontinuance of treatment during the progression of ribavirin-induced anemia.

Methods: One hundred and sixteen patients (71% male) with genotype 1 chronic hepatitis C were treated with pegylated interferon (PegIFN) α -2b and ribavirin. The mean age was 50.6 years and 55% were IFN naive. A decline of Hb concentration by 2 g/dL at two weeks from the start of the treatment ("2 by 2" standard) was adopted as the predictive factor for the progression of anemia.

Results: By applying the "2 by 2" standard, with $\Delta\text{Hb} \geq 2$ g/dL (34%, $n = 39$), treatment was discontinued in 12 cases (31%), three of which (8%) because of severe anemia. For

$\Delta\text{Hb} < 2$ g/dL (64%, $n = 76$), treatment was discontinued in 11 (14%) cases; none due to severe anemia. Ten percent (4/39) of patients showed the minimum $\text{Hb} \leq 8.5$ g/dL in the $\Delta\text{Hb} \geq 2$ g/dL group, with none in the $\Delta\text{Hb} < 2$ g/dL group ($P = 0.001$). Furthermore, the patients with minimum $\text{Hb} \leq 8.5$ g/dL were found only in the "2 by 2" standard-positive and low CL/F (<15) group (4/29, 14%).

Conclusion: Monitoring the Hb decline using the "2 by 2" standard can identify patients who are prone to developing severe anemia. Further prospective studies are needed using ribavirin reduction based on the "2 by 2" standard.

Key words: "2 by 2" standard, chronic hepatitis C, pegylated interferon and ribavirin combination therapy, progression of anemia

INTRODUCTION

THE AIM OF antiviral therapy for hepatitis C virus (HCV) is to obtain a sustained viral response (SVR) and to reduce the occurrence rate of hepatocellular

carcinoma or hepatic disease-related mortality.^{1,2} The current optimal therapy for patients with chronic hepatitis C is a combination of pegylated interferon (PegIFN) and ribavirin. This combination can significantly improve the SVR rate and is recommended as a standard regimen worldwide.³⁻⁸ However, the SVR rates for the combination therapy of ribavirin with PegIFN for naive patients with HCV genotype 1 has been reported to be 42-52%,^{6,9,10} which means that eradication of HCV is not complete in approximately half of these patients. Recently, long-term treatment¹¹ and a higher dosage

Correspondence: Dr Naoki Hiramatsu, Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita City, Osaka 565-0871, Japan. Email: hiramatsu@gh.med.osaka-u.ac.jp
Received 29 December 2006; revision 11 April 2007; accepted 25 May 2007.

of drugs^{12,13} have been used to try to raise the SVR rate for patients with HCV genotype 1. However, it remains to be established what constitutes satisfactory efficacy. In this study we focused on a treatment strategy to enable the prediction of severe side-effects in order to avoid the need to discontinue treatment and raise the SVR rate by PegIFN and ribavirin combination therapy. It is important that ribavirin, the key drug for eradicating HCV, is continued until the end of treatment in order to attain the maximum SVR rate. Hemolytic anemia induced by ribavirin is known as one of the most important adverse effects in the combination therapy of PegIFN and ribavirin.^{14–17} To decrease the discontinuance rate of ribavirin due to severe anemia, epoetin alfa has been used for patients with progressing anemia, which can maintain the dose level of ribavirin as well as the quality of life of the patients.^{18–20} However, from a cost-effectiveness standpoint, it would be difficult for this treatment strategy to become standard. Also, side-effects other than anemia arising from an overload of ribavirin mainly due to renal dysfunction cannot be avoided by the additional administration of epoetin alfa.

Hemolysis induced by ribavirin has been suggested to be related to a high plasma concentration of ribavirin.²¹ The apparent clearance of ribavirin (CL/F), which reflects its plasma concentration at four weeks after the start of combination therapy, has been used as a predictive factor for ribavirin-induced hemolytic anemia before the start of treatment.^{22–24} However, the progression of hemolytic anemia occurs due not only to hemolysis, but also impaired hematogenous function. On the other hand, hemoglobin (Hb) dynamics directly reflect the degree of progression of anemia. We have reported that the early decline of Hb correlates with the progression of anemia during IFN and ribavirin combination therapy.²⁵ It is necessary to verify that a similar early predictor for the progression of anemia can be adopted in PegIFN and ribavirin combination therapy, since PegIFN is known to induce less depression of bone marrow function than usual IFN.

In this study, we evaluated the utility of the early decline of Hb in comparison with the CL/F to predict the progression of anemia in the combination therapy of PegIFN and ribavirin.

METHODS

Patients

THIS STUDY WAS conducted at 12 institutions in Japan. A total of 116 patients with chronic hepatitis C were enrolled and treated with a combination of

Table 1 Patient characteristics

Age (years)	50.6 ± 10.1 (24–70)
Gender (male/female)	82/34 (male 70.7%)
Body weight (kg)	64.5 ± 11.1
Previous IFN therapy (naïve/relapser/no responder)	64/38/14
HCV-RNA level (KIU/L) (<500/500–850/850<)	18/27/71
ALT (IU/L)	110 ± 60 (33–76)
Crnn (mg/dL)	0.9 ± 0.2
Liver histology	
Fibrosis (F1/F2/F3/unknown)	35/49/31/1
Activity (A1/A2/A3/A4)	15/33/56/12
WBC (/mm ³)	5317 ± 1207
Neutrocytes (/mm ³)	2778 ± 902
Platelets (×10 ⁴ /mm ³)	17.4 ± 4.0
RBC (×10 ⁴ /mm ³)	459 ± 41
Hemoglobin (g/dL)	14.5 ± 1.2

Data are given as the mean ± SD.

ALT, alanine transaminase; RBC, red blood cells; WBC, white blood cells.

PegIFN and ribavirin. All patients were anti-hepatitis C virus antibody positive, had HCV-RNA detectable in their serum by the polymerase chain reaction (PCR) method, and showed elevated serum alanine transaminase (ALT) (above the upper limit of the normal), serum Hb concentration ≥12 g/dL, neutrocytes ≥1500/mm³ and platelets ≥10⁵/mm³ within six months before the treatment. Exclusion criteria were the presence of hepatitis B surface antigen, antihuman immunodeficiency virus antibody and other forms of liver disease (alcoholic liver disease, hepatotoxic drugs, autoimmune hepatitis).

The baseline characteristics of the patients are shown in Table 1. The mean age was 50.6 ± 10.1 years, and 71% (82 patients) were male. All patients had HCV-RNA with genotype 1 and high viral loads (more than 10⁵ copies/mL serum by Amplicor-HCV monitor assay). The mean ALT level was 110 ± 60 IU/L. Sixty-four patients (55%) were IFN naïve and the others were undergoing retreatment.

Treatment schedule

All patients were treated with a combination of PegIFN α-2b (Pegintron; Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA) and ribavirin (Rebetol; Schering-Plough) for 48 weeks. PegIFN was administered at a mean of 1.5 µg/kg body weight subcutaneously once a week. Ribavirin was given orally twice a day for the total dose. Dosages of both medications were decided based on the

body weight of the patients: those with a body weight of 40–60 kilograms (kg) were given PegIFN 75 µg/body and ribavirin 600 mg/day, those with a body weight of 60–80 kg were given PegIFN 105 µg/body and ribavirin 800 mg/day, and those with a body weight of 80–100 kg were given PegIFN 135 µg/body and ribavirin 1000 mg/day. The PegIFN dose was reduced by 50% if the neutrocyte count was below 750/mm³ or the platelet (Plt) count was below 8 × 10⁴/mm³. The PegIFN was discontinued if the neutrocyte count was below 500/mm³ or the Plt count was below 5.0 × 10⁴/mm³. The ribavirin dose of 200 mg was reduced when the Hb concentration decreased to less than 10 g/dL and the ribavirin was discontinued when the Hb concentration decreased to less than 8.5 g/dL, in accordance with the drug information for ribavirin. No ferric medicine or erythropoietin to prevent anemia was administered.

Patients with persistently undetectable HCV-RNA six-months after the end of treatment were considered to have achieved SVR.

Blood tests

All patients were examined for serum HCV-RNA level, hematological and biochemical tests just before therapy, at the end of week 2 and every four weeks during the treatment. When the treatment was completed, the patients were assessed every four weeks up to 24 weeks after the end of treatment.

Total ribavirin clearance

Using the method of Kamar *et al.*, CL/F at the start of the treatment was calculated as follows: CL/F (L/h) = 32.3 × BW × (1 – 0.0094 × age) × (1 – 0.42 × sex)/Scr (BW, body weight; sex = 0 for male and 1 for female; Scr = serum creatinine).¹⁷

Definition of “severe anemia” leading to the discontinuance of ribavirin

In this study, the “discontinuance of ribavirin due to severe anemia” was defined as follows: discontinuance of ribavirin due to a decrease of Hb to less than 8.5 g/dL or clinical symptoms of anemia associated with a decrease of Hb of more than 3 g/dL from the start of the combination therapy.

Statistical analysis

Age, body weight, ribavirin dosage/body weight, white blood cell count, red blood cell count, Hb concentration, Plt, serum ALT levels and serum creatinine are expressed as mean ± SD. The SVR rate was evaluated using the intention-to-treat analysis (ITT analysis). The

differences in proportions were tested by the χ^2 -test and Mantel-Haenszel χ^2 -test. A value of $P < 0.05$ (two-tailed) was considered to indicate significance. All calculations were performed by SAS program 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RESULTS

Frequency and reasons for dose reduction or discontinuance of PegIFN and/or ribavirin

OF THE 116 patients, 92 completed 48 weeks of therapy, but 24 patients (21%) had to discontinue both PegIFN and ribavirin. Thirty-nine patients (34%) completed the entire treatment schedule without reduction or discontinuance of either drug. The ribavirin dose was decreased for 39 patients (34%) and the PegIFN dose was decreased for 33 patients (28%), including 19 patients for whom both drugs had to be reduced. The reasons for discontinuance of both drugs included anemia, thyroid dysfunction, skin eruption and neutropenia, with the major reasons being anemia (17%) and thyroid dysfunction (17%).

Efficacy of the combination therapy with dose reduction or discontinuance of PegIFN and/or ribavirin

The SVR rate was 57% (66/116) for all according to ITT analysis. According to the category of response to previous IFN therapy, the SVR rates were 43% (6/14) in

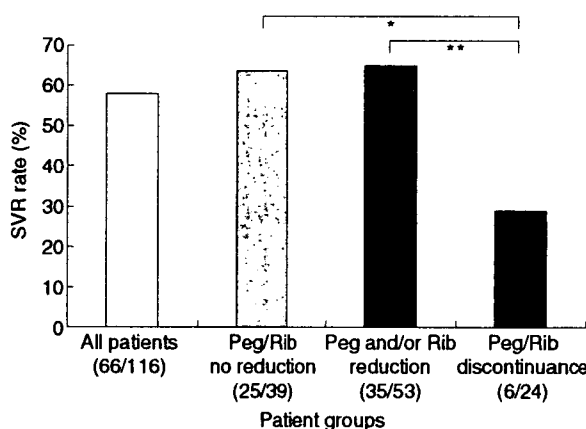


Figure 1 SVR rate due to PegIFN/ribavirin dose reduction or discontinuance. (□), All patients; (▨), patients without dose reduction; (▩), patients with dose reduction; (■), patients with drug discontinuance. Significant levels: * $P = 0.003$; ** $P = 0.001$.

Table 2 Rate of the ribavirin reduction or discontinuance due to adverse effects according to CL/F level

	No reduction	Dose reduction	Discontinuance	
			All cases	Cases due to severe anemia
20 ≤ CL/F (n = 12)	67% (8/12)	25% (3/12)	8% (1/12)	0
15 ≤ CL/F < 20 (n = 23)	57% (13/23)	30% (7/23)	13% (3/23)	0
10 ≤ CL/F < 15 (n = 39)	46% (18/39)	31% (12/39)	23% (9/39)	5% (2/39)
CL/F < 10 (n = 42)	33% (14/42)	40% (17/42)	26% (11/42)	5% (2/42)

P = 0.031 (Mantel-Haenszel χ^2 -test).

Table 3 Minimum hemoglobin levels during PegIFN/ribavirin combination therapy according to CL/F level

	10 g/dL < Hb	8.5 < Hb ≤ 10 g/dL	Hb ≤ 8.5 g/dL
20 ≤ CL/F (n = 12)	92% (11/12)	12% (1/12)	0
15 ≤ CL/F < 20 (n = 23)	83% (19/23)	17% (4/23)	0
10 ≤ CL/F < 15 (n = 39)	72% (28/39)	23% (9/39)	5% (2/39)
CL/F < 10 (n = 42)	50% (21/42)	43% (18/42)	7% (3/42)

P = 0.009 (Mantel-Haenszel χ^2 -test).

non-responders, 61% (23/38) in relapsers, and 58% (37/64) in naïve patients. The relationship between dose reduction or discontinuance of PegIFN and ribavirin and the SVR rate on ITT analysis is shown in Figure 1. Similar SVR rates were obtained in the groups without dose reduction of PegIFN and ribavirin (64%, 25/39) and with reduction of PegIFN and/or ribavirin (66%, 35/53); in detail, the SVR rate was 79% (11/14) in the group with reduction of only PegIFN, 55% (11/20) with reduction of only ribavirin, and 63% (12/19) with reduction of both PegIFN and ribavirin. In the group where both drugs were discontinued, the SVR rate was 25% (6/24), significantly lower than the group without reduction of both drugs ($P = 0.003$), and the group with reduction of PegIFN and/or ribavirin ($P = 0.001$).

CL/F and dose reduction or discontinuance of ribavirin

CL/F calculated for all patients showed a median of 12.6 L/h (range 4.5–27.9). At the start of the treatment, 36% (42/116) were under 10 L/h, 34% (39/116) were 10–15 L/h, 20% (23/116) were 15–20 L/h and 10% (12/116) were 20 L/h or more.

The rate of dose reduction or discontinuance of ribavirin is shown in Table 2 for different levels of CL/F. The rate of discontinuance of ribavirin in all cases was 8% (1/12) for the CL/F ≥ 20, 13% (3/23) for the 15 ≤ CL/F < 20, 23% (9/39) for the 10 ≤ CL/F < 15, and

26% (11/42) for the CL/F < 10 group. Ribavirin did not have to be discontinued due to severe anemia among patients with 15 ≤ CL/F, but did for the 18% (2/11) of those with CL/F < 10 and 22% (2/9) of those with 10 ≤ CL/F < 15. The rate of reduction and discontinuance of ribavirin correlated significantly with the CL/F level.

CL/F and minimum hemoglobin level during treatment

To examine the relationship between anemia and the cessation of ribavirin in further detail, we evaluated the minimum hemoglobin level during treatment. Table 3 presents the different levels in relation to CL/F. The patients with minimum Hb ≤ 8.5 g/dL, the criterion for discontinuance of ribavirin, accounted for 7% (3/42) of the group of CL/F < 10, and 5% (2/39) of the group of 10 ≤ CL/F < 15. No patients of the group of CL/F ≥ 15 showed minimum Hb ≤ 8.5 g/dL.

Early decline of Hb and progression of anemia during combination therapy

Following the initiation of combination therapy, the Hb concentration decreased rapidly until the end of four-weeks. At the end of two weeks, Hb had decreased by 1.1 ± 1.0 g/dL among the patients without dose reduction of ribavirin ($n = 53$), 1.6 ± 1.2 g/dL among those with dose reduction ($n = 39$), and 1.8 ± 1.0 g/dL among

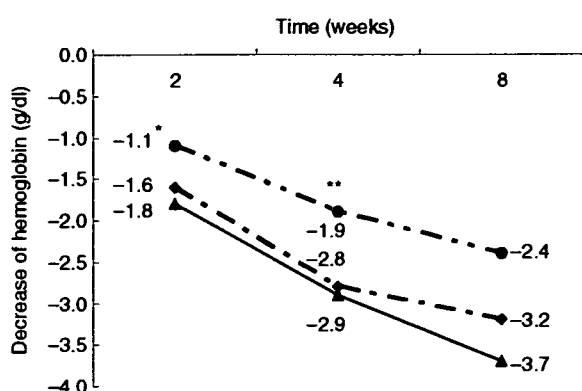


Figure 2 Course of Δ Hb in the initial phase. (— · — · —), No reduction; (— · — · —), reduction; (— — —), discontinuance. *Significantly different between patients with discontinuance and patients with no reduction ($P=0.04$). **Significantly different between patients with discontinuance and patients with no reduction ($P=0.008$), and between patients with discontinuance and patients with reduction ($P=0.003$).

those who had discontinued ribavirin ($n=24$). It was significantly different between the patients with no reduction and those with discontinuance of therapy ($P=0.04$). At the end of four weeks, Hb had decreased by 1.9 ± 1.2 g/dL among the patients without dose reduction of ribavirin, 2.8 ± 1.2 g/dL among those with dose reduction, and 2.9 ± 1.2 g/dL among those who had discontinued ribavirin. Hb decline at the end of four weeks was significantly greater in the patients who had discontinued treatment and those who had reduced it, than in those with no reduction ($P=0.008$, $P=0.003$, respectively) (Fig. 2).

In this study, we selected the Hb decrease at the end of two weeks as the predictive factor for anemia progression. This is because the judgment of Hb decrease at the end of four weeks is too late to prevent progression of anemia or to perform appropriate counter-measures, such as the administration of epoetin or reduction of ribavirin. Next, we tried to use two borderlines of Δ Hb:

Δ Hb 2.0 indicates a 2 g/dL Hb decrease at the end of two weeks and Δ Hb 1.5 indicates a 1.5 g/dL Hb decrease. When Δ Hb 2.0 was adopted, the rate of discontinuance of drugs was 31% (12/39) in the Δ Hb ≥ 2.0 and 14% (11/76) in the Δ Hb < 2.0 . When Δ Hb 1.5 was adopted, it was 23% (14/60) in the Δ Hb ≥ 1.5 and 16% (9/55) in the Δ Hb < 1.5 . Comparison of the Δ Hb 2.0 and Δ Hb 1.5 standards showed the sensitivity to be 52% (12/23) and 61% (14/23), and the specificity to be 71% (65/92) and 50% (46/92), respectively. With respect to discontinuance due to anemia, both Δ Hb 2.0 and Δ Hb 1.5 gave 100% sensitivity (3/3), and the specificities were 68% (76/112) using Δ Hb 2.0 and 49% (55/112) using Δ Hb 1.5. We decided to adopt the standard of Δ Hb 2 g/dL at the end of two weeks from the start of the pegylated IFN and ribavirin combination therapy as the predictive factor for anemia progression ("2 by 2" standard), which has been taken as a predictive factor for anemia in the IFN and ribavirin combination therapy.²⁵

Applying the "2 by 2" standard to PegIFN plus ribavirin combination therapy, the rate of reduction or discontinuance of the ribavirin dose was examined with respect to the Hb decrease level (Table 4). Only one patient was excluded from this study, because the treatment was discontinued on the 11th day. In the group of Δ Hb (the decrease in Hb concentration at two weeks from the baseline) ≥ 2 g/dL ($n=39$), the doses were reduced for 18 patients (46%) and discontinued for 12 (31%), three of whom (8%) had severe anemia. For the group of Δ Hb < 2 g/dL (76 patients), the doses were reduced for 21 patients (28%) and discontinued for 11 (14%); none due to severe anemia.

Early decline of Hb and minimum hemoglobin level during treatment

As in the case of Δ Hb, we evaluated the minimum hemoglobin level during treatment, as shown in Figure 3. The patients with minimum Hb ≤ 8.5 g/dL accounted for 10% (4/39) of the group of Δ Hb ≥ 2 g/dL, and there was no patient with minimum Hb ≤ 8.5 g/dL

Table 4 Rate of the ribavirin reduction or discontinuance due to adverse effects according to Hb decrease levels

	No reduction	Dose reduction	Discontinuance	
			All cases	Cases due to severe anemia
Δ Hb < 2 g/dL ($n=76$)	58% (44/76)	28% (21/76)	14% (11/76)	0
Δ Hb ≥ 2 g/dL ($n=39$)	23% (9/39)	46% (18/39)	31% (12/39)	8% (3/39)

$P=0.004$ (Mantel-Haenszel χ^2 -test).

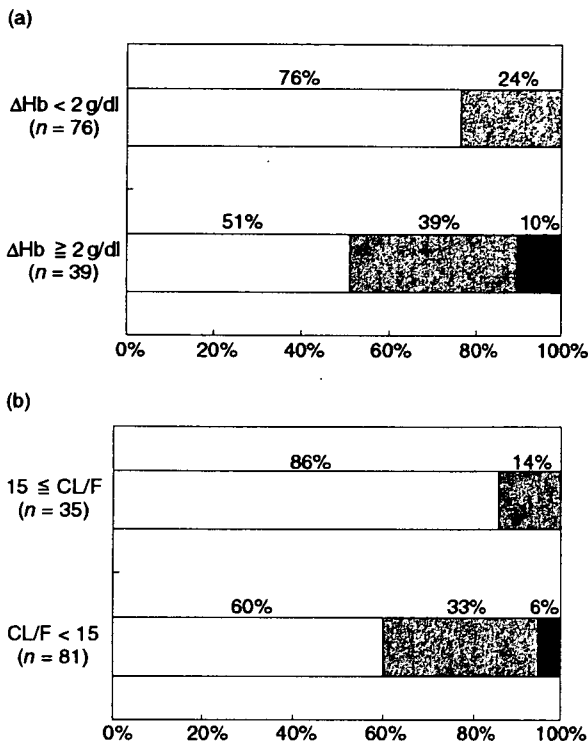


Figure 3 Minimum hemoglobin levels during PegIFN/ribavirin combination therapy. (□), 10 g/dL < minimum Hb; (▨), 8.5 < minimum Hb ≤ 10 g/dL; (■), minimum Hb ≤ 8.5 g/dL. (a) According to the "2 by 2" standard (Hb 2 g/dL decrease at two weeks from the baseline). *P* = 0.009 (Mantel-Haenszel χ^2 -test). (b) according to CL/F levels. *P* = 0.001 (Mantel-Haenszel χ^2 -test).

in the $\Delta Hb < 2$ g/dL group (Fig. 3a). The patients with minimum Hb ≤ 8.5 g/dL accounted for 6% (5/81) of the group of CL/F < 15, and there was no patient with minimum Hb ≤ 8.5 g/dL in the $15 \leq CL/F$ group (Fig. 3b). The number of patients with minimum Hb ≤ 8.5 g/dL during PegIFN and ribavirin combination therapy according to "2 by 2" standard and CL/F levels is shown in Table 5. The patients with minimum Hb ≤ 8.5 g/dL were found only in the "2 by 2" standard-positive and low CL/F (<15) group (4/29, 14%).

DISCUSSION

PREDICTION OF THE progression of anemia is necessary to decide whether drugs can be continued, with minimization of the disadvantages induced by anemia. Recently, CL/F has been used as a marker of

Table 5 The number of patients with minimum hemoglobin ≤ 8.5 g/dL during PegIFN/ribavirin combination therapy according to "2 by 2" standard and CL/F levels

	$\Delta Hb < 2$ g/dL (n = 76)	$\Delta Hb \geq 2$ g/dL (n = 39)
CL/F ≥ 15 (n = 35)	0/25	0/10
CL/F < 15 (n = 80)	0/51	4/29 (14%)

progressing anemia that necessitates discontinuance of treatment. For example, if the patients have a low CL/F level, they should start treatment with a low ribavirin dose. In this study, we attempted to use the CL/F level measurement for our patients. To predict which patients might have to discontinue the treatment, the target range had to be CL/F < 15 because 6% of patients (n = 5) in this range showed minimum Hb ≤ 8.5 g/dL, which is the level at which ribavirin should be discontinued. No patients of the CL/F ≥ 15 group showed minimum Hb ≤ 8.5 g/dL. Our findings showed that 70% of the patients (81/116) with CL/F < 15 should be discriminated from the others (Table 3). In the same manner, using ΔHb as the marker, 34% of the target patients in the $\Delta Hb \geq 2$ g/dL group were identified because 10% in this range showed minimum Hb ≤ 8.5 g/dL. No patients in the $\Delta Hb < 2$ g/dL group showed minimum Hb ≤ 8.5 g/dL. Compared to CL/F, ΔHb is considered to be more sensitive and convenient for identifying the high risk patients for whom treatment would need to be discontinued. Furthermore, the application of "2 by 2" standard in the group with low level of CL/F < 15 can be the most sensitive method for this (Table 5), since no patients with progression of anemia were found in the "2 by 2" standard-negative group with CL/F < 15.

In Japan, ribavirin doses are set at 600 mg for <60 kg, 800 mg for 60-80 kg, and 1000 mg for ≥ 80 kg, which are lower doses than those used in Europe and the USA. In this study, the mean ribavirin level at the start of treatment was 743 mg per day, while the AASLD practice guideline for genotype 1 hepatitis C is a daily dose of 1000 mg for body weight ≤ 75 kg and 1200 mg if >75 kg²⁶. In Japan, the use of lower doses is why fewer patients treated with PegIFN and ribavirin combination therapy are forced to discontinue the treatment due to severe anemia. Since the "2 by 2" model and/or CL/F can identify the patients who are prone to develop severe anemia, the other patients could be candidates for ribavirin dose-up strategies to raise SVR rates.

A considerable number of patients with chronic hepatitis C are over 60 years old in Japan (mean age is

around 55 years old),²⁷ although the mean age of this study was 50.6 years old. The number of aged patients with chronic hepatitis C is expected to increase in Europe and the USA, as well as in Japan. In IFN and ribavirin combination therapy, the discontinuance rate due to anemia was significantly higher in aged patients (≥ 60 years old, 21%) than in younger patients (< 60 years old, 9%) ($P < 0.001$).²⁵ Earlier prediction of anemia is necessary to reduce the ribavirin dose in order to prevent the progression of severe anemia or to start epoetin alfa administration as needed, especially with aged patients. The "2 by 2" standard in PegIFN and ribavirin combination therapy should be a useful and convenient device for predicting the progress of anemia and treatment discontinuance in Europe and the USA, as well as in Japan.

CONCLUSION

IN CONCLUSION, THIS paper has shown that the SVR rate can be raised by preventing the discontinuance of ribavirin in PegIFN and ribavirin combination therapy. What is now needed is a prospective study of whether the early reduction of ribavirin in "2 by 2" standard-positive patients can improve the SVR rates, to ascertain the utility of the "2 by 2" standard in PegIFN and ribavirin combination therapy.

REFERENCES

- 1 Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K *et al.* Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Osaka Liver Disease Study Group. *Hepatology* 1998; 27: 1394–402.
- 2 Imai Y, Kasahara A, Tanaka H *et al.* Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1069–77.
- 3 Hayashi N, Takehara T. Antiviral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2006; 41: 17–27.
- 4 Poynard T, Marcellin P, Lee SS *et al.* Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998; 352: 1426–32.
- 5 McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485–92.
- 6 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958–65.
- 7 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975–82.
- 8 Hiramatsu N, Kasahara A, Nakanishi F *et al.* The significance of interferon and ribavirin combination therapy followed by interferon monotherapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *Hepatol Res* 2004; 29: 142–7.
- 9 Bruno S, Camma C, Di Marco V *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for naive patients with genotype 1 chronic hepatitis C: a randomized controlled trial. *J Hepatol* 2004; 41: 474–81.
- 10 Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR *et al.* Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346–55.
- 11 Berg T, Von Wagner M, Nasser S *et al.* Extended treatment duration for Hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006; 130: 1086–97.
- 12 Lodato F, Azzaroli F, Brillanti S *et al.* Higher doses of peginterferon alpha-2b administered twice weekly improve sustained virological response in difficult-to-treat patients with chronic hepatitis C: results of a pilot randomized study. *J Viral Hepat* 2005; 12: 536–42.
- 13 Lindahl K, Stahle L, Bruchfeld A, Schvarcz R. High-dose ribavirin in combination with standard dose peginterferon for treatment of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 275–9.
- 14 Bodenheimer HC Jr, Lindsay KL, Davis GL *et al.* Tolerance and efficacy of oral ribavirin treatment of chronic hepatitis C: a multicenter trial. *Hepatology* 1997; 26: 473–7.
- 15 De Franceschi L, Fattovich G, Turrini F *et al.* Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: role of membrane oxidative damage. *Hepatology* 2000; 31: 997–1004.
- 16 Van Vlierbergh H, Delanghe JR, De Vos M, Leroux-Roel G. Factors influencing ribavirin-induced hemolysis. *J Hepatol* 2001; 34: 911–16.
- 17 Tappero G, Ballare M, Farina M, Negro F. Severe anemia following combined alpha-interferon/ribavirin therapy of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998; 29: 1033–4.
- 18 Afdhal NH, Dieterich DT, Pockros PJ *et al.* Epoetin alfa maintains ribavirin dose in HCV-infected patients: a prospective, double-blind, randomized controlled study. *Gastroenterology* 2004; 126: 1302–11.
- 19 Pockros PJ, Shiffman ML, Schiff ER *et al.* Epoetin alfa improves quality of life in anemic HCV-infected patients receiving combination therapy. *Hepatology* 2004; 40: 1450–8.
- 20 Dieterich DT, Wasserman R, Brau N *et al.* Once-weekly epoetin alfa improves anemia and facilitates maintenance

- of ribavirin dosing in hepatitis C virus-infected patients receiving ribavirin plus interferon alfa. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2491-9.
- 21 Lindahl K, Schvarcz R, Bruchfeld A, Stahle L. Evidence that plasma concentration rather than dose per kilogram body weight predicts ribavirin-induced anaemia. *J Viral Hepat* 2004; 11: 84-7.
- 22 Jen JF, Glue P, Gupta S, Zambas D, Hajian G. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 555-65.
- 23 Kamar N, Chatelut E, Manolis E, Lafont T, Izopet J, Rostaing L. Ribavirin pharmacokinetics in renal and liver transplant patients: evidence that it depends on renal function. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 140-6.
- 24 Karino Y, Kato T, Arakawa T *et al.* Total clearance (CL/F) of ribavirin is the factor most influencing the incidence of hemolytic anemia during IFN plus ribavirin therapy. *Hepatology* 2004; 40 (Suppl 1): 358.
- 25 Oze T, Hiramatsu N, Kurashige N *et al.* Early decline of hemoglobin correlates with progression of ribavirin-induced hemolytic anemia during interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2006; 41: 862-72.
- 26 Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1147-67.
- 27 Hiramatsu N, Oze T, Tsuda N *et al.* Should aged patients with chronic hepatitis C be treated with interferon and ribavirin combination therapy? *Hepatol Res* 2006; 35: 185-9.