

Figure 4. (A) Western blot analysis. Five lanes were SVR (lanes 1–5), 4 lanes were NVR (lanes 6–9), and 3 lanes were non-HCV control (lanes 10–12). Specific bands for Cardif and β -actin are indicated by arrows. (B) Expression level of Cardif protein normalized to β -actin in the liver biopsy specimens according to ultimate treatment response. Error bars indicate the standard error.

in these patients, suggesting that NVR patients may have adopted a different equilibrium in their immune response to the virus. In contrast to the expression of RIG-I and MDA5, Cardif mRNA, which was expressed in a relatively constitutive fashion, was significantly lower in NVR. Our ROC analysis highlights that lower expression of Cardif relative to that of RIG-I was one of the strongest predictors for NVR. Moreover, Western blot analysis further confirmed the down-regulation of Cardif in NVR patients, as demonstrated by its protein level. Because Cardif is one of the substantial target molecules of HCV evasion,^{11,20} it is likely that Cardif expression is suppressed by HCV with resistant phenotype or is inadequate in NVR patients. Loo et al have demonstrated a Cardif cleavage product in 2 of 4 liver tissue samples of chronic HCV infection.²³ In our study, however, the Cardif cleavage product was not detected, presumably because the product could be unstable in vivo, resulting in rapid degradation. Although further studies are necessary to elucidate mechanisms of Cardif down-regulation, our findings of lower expression of Cardif in NVR

suggested that the status of Cardif expression in the liver might have a significant effect on the ultimate outcome of antiviral treatment.

The antiviral effect brought by RIG-I/Cardif signaling is regulated by the coordination of negative and positive regulators. It has been shown that RNF125 functions as a negative regulator of RIG-I/Cardif signaling. RNF125 is an ubiquitin E3-ligase with activity against protein containing CARD domains, such as RIG-I, MDA5, and Cardif, and these ubiquitinated molecules undergo proteasomal degradation. In contrast, RNF125 do not have negative function against LGP2, a negative regulator of RIG-I signaling, because LGP2 lacks CARD domain. In contrast to RIG-I, RNF125 expression was rapidly suppressed by exogenous IFN; therefore, observed lower basal hepatic level of RNF125 in NVR could be explained by the suppressive effect of endogenous IFN, which may be up-regulated in NVR patients. Hence, RNF125 may constitute a negative regulatory circuit for IFN production and is responsible for responsiveness to PEG-IFN and ribavirin therapy.

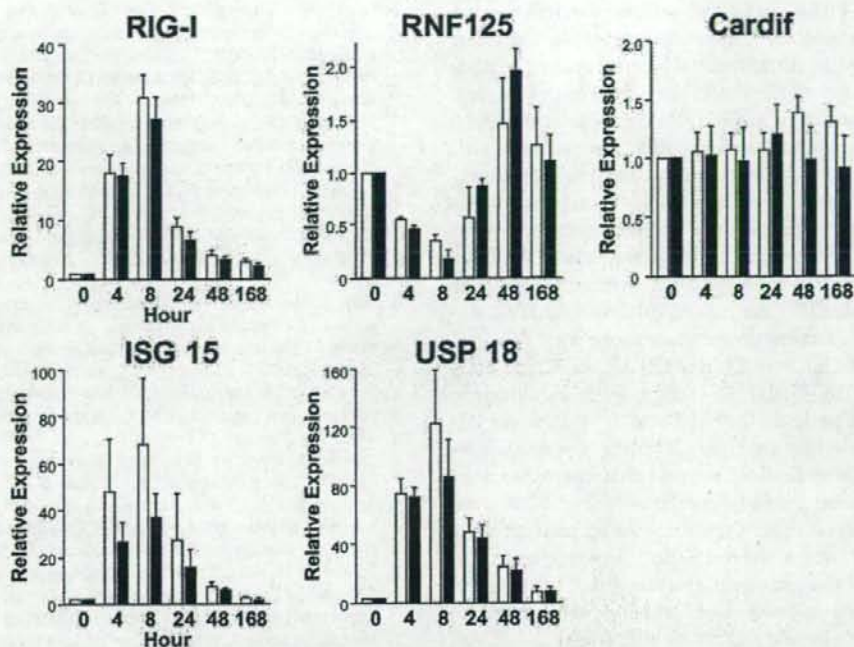


Figure 5. Transcriptional responses during PEG-IFN- α -2b and ribavirin therapy in PBMC ($n = 14$). Open columns indicate SVR ($n = 7$), and solid columns indicate NVR ($n = 7$). Error bars indicate the standard error. The P values determined by Mann-Whitney U test between 2 groups at 8 hours were as follows: RIG-I, $P .3$; RNF125, $P .3$; Cardif, $P .7$; ISG15, $P .3$; USP18, $P .2$.

It has been shown that RIG-I function is modified by ISG15 via ISGylation.¹⁷ Consistent with our data, Chen et al identified 18 genes, including ISG15 and USP18, whose expression differed between responders and non-responders.²⁶ Interestingly, a recent study has shown that USP18 negatively regulates IFN signaling independently of its isopeptidase activity toward ISG15 by binding to the IFNAR2 receptor subunit and blocking the interaction between Janus kinase and the IFN receptor.²⁷ Moreover, the siRNA knockdown of USP18 in human cells has consistently been shown to potentiate the ability of IFN to inhibit HCV RNA replication.²⁸ Therefore, USP18 is suggested as a novel *in vivo* inhibitor of signal transduction pathways that are specifically triggered by type I IFN. Consistent with a role for USP18 in down-regulating the antiviral IFN response, we confirmed that up-regulation of USP18 was one of the factors predicting a lack of response to treatment with IFN.

The mechanism underlying the association of gene expression involving innate immunity with resistance to therapy is not well understood. Our human study with HCV patients treated by PEG-IFN and ribavirin highlights RIG-I/Cardif, RIG-I/RNF125, and ISG15/USP18, which is partly responsible for the clinical responsiveness to antiviral therapy. RIG-I signaling by viral pathogens may affect a wide variety of responses in not only innate but also acquired immunity. Our study is the first to

demonstrate the potential relevance between molecules involving innate immunity and the clinical response to antiviral therapy.

In addition, sequential analysis of expression profile during PEG-IFN- α -2b and ribavirin treatment was also performed in this study. Lanford et al demonstrated transcriptional response to IFN- α in chimpanzee by genome microarray analysis, which included RIG-I, ISG15, and USP18.²⁹ An association of transcriptional response with early phase of virologic response has been also reported in PBMC or liver biopsy specimen.³⁰⁻³² We recently reported that the transcriptional double-stranded RNA-activated protein kinase response during treatment with PEG-IFN- α -2b and ribavirin was associated with the ultimate clinical response.³⁰ Similarly, the present study demonstrated a strong and rapid increase of RIG-I, ISG15, and USP18 mRNA in response to clinical PEG-IFN treatment especially in SVR patients, although few patients were available to achieve statistical significance between SVR and NVR. In marked contrast, transcriptional response of RNF125 exhibited a triphasic pattern. Rapid suppression seen in the first phase was presumably because of a negative regulatory effect of IFN. However, increase of RNF125 mRNA in the second phase, which tended to be greater in NVR, may be responsible for inhibiting RIG-I expression seen 8-48 hours after PEG-IFN- α -2b administration. Although limitations includ-

ing the use of PBMC and small sample size still deserve mention, the sequential expression profile during treatment may provide further valuable information regarding the prediction of the clinical response to the therapy and the mechanism of action of antiviral treatment.

In the present study, we have included patients with genotype 1b because it is imperative to designate a virologically homogeneous patient group to associate individual treatment responses with different gene expression profiles that direct innate immune responses. We have preliminarily studied genotype 2 patients and found that Cardif and RNF125 gene expression levels in NVR patients were significantly lower than those with SVR patients ($P = .03$ and $P = .04$, respectively) and that RIG-I/Cardif and RIG-I/RNF125 ratios were significantly higher in NVR patients ($P = .02$ and $P = .009$, respectively, see Supplementary Figure 2 online at www.gastrojournal.org). These findings suggest that the differences in gene expression profiles between SVR and NVR were almost identical to those demonstrated in patients with genotype 1b. However, the correlation between treatment responses in all the genotypes and the different status of innate immune responses needs to be explored. Further studies may be necessary to clarify this issue.

In conclusion, the results of the present study offer potentially important clinical implications for patients with chronic hepatitis C who are treated with PEG-IFN- α and ribavirin. Quantifying hepatic gene expression of the RIG-I/Cardif system, including its regulators before treatment, is useful in identifying patients who are at a higher risk for NVR. The data from these assays can provide valuable information that may influence the decision about the treatment strategy in each individual patient. Finally, this clinical human study demonstrates the potential relevance of the molecules involving innate immunity to the clinical response to therapy. Our data will help understand the pathogenesis of HCV resistance and development of new antiviral therapy targeted toward the innate immune system.

Supplementary Data

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.019.

References

- Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, et al. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990;12:671-675.
- 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;358:958-965.
- Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982.
- Hadziyannis SJ, Sette HJ, Morgan TR, et al. PEGASYS International January 2006 American Gastroenterological Association 253 Study Group. Peginterferon- α -2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355.
- Zeuzem S, Pawlotsky JM, Lukasiewicz E, et al. DITTO-HCV Study Group. International, multicenter, randomized, controlled study comparing dynamically individualized versus standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2005;43:250-257.
- 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- α -2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006;130:1086-1097.
- Biron CA. Initial and innate responses to viral infections—pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:374-381.
- Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005;436:939-945.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsumura T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-737.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005;175:2851-2858.
- Meylan E, Curran J, Hofmann K, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167-1172.
- Kawai T, Takahashi K, Sato S, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005;6:981-988.
- Seth RB, Sun L, Ea CK, et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3. *Cell* 2005;122:669-682.
- Xu LG, Wang YY, Han KJ, et al. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- β signaling. *Mol Cell* 2005;19:727-740.
- Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, et al. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-1. *J Immunol* 2005;175:5260-5268.
- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, et al. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7500-7505.
- Zhao C, Denison C, Hulbregtse JM, et al. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10200-10205.
- Schwer H, Liu LQ, Zhou L, et al. Cloning and characterization of a novel human ubiquitin-specific protease, a homologue of murine UBP43 (Usp18). *Genomics* 2000;65:44-52.
- Malakhov MP, Malakhova OA, Kim KI, et al. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem* 2002;277:9976-9981.
- Li XD, Sun L, Seth RB, et al. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17717-17722.
- Nakagawa M, Sakamoto N, Tanabe Y, et al. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 2005;129:1031-1041.
- Asahina Y, Izumi N, Uchihara M, et al. A potent antiviral effect on hepatitis C viral dynamics in serum and peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with high-dose daily

- interferon α plus ribavirin and intravenous twice-daily treatment with interferon β . *Hepatology* 2001;34:377-384.
23. Loo YM, Owen DM, Li K, et al. Viral and therapeutic control of IFN- β promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6001-6006.
 24. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006;130:231-264.
 25. National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Statement: management of hepatitis. *Hepatology* 2002;36(Suppl 1):S3-S20.
 26. Chen L, Borozan I, Feld J, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 2005;128:1437-1444.
 27. Malakhova OA, Kim KI, Luo JK, et al. UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *EMBO J* 2006;25:2358-2367.
 28. Randall G, Chen L, Panis M, et al. Silencing of USP18 potentiates the antiviral activity of interferon against hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2006;131:1584-1591.
 29. Lanford RE, Guerra B, Lee H, et al. Genomic response to interferon- α in chimpanzees: implications of rapid down-regulation for hepatitis C kinetics. *Hepatology* 2006;43:961-972.
 30. Asahina Y, Izumi N, Umeda N, et al. Pharmacokinetics and enhanced PKR response in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon α -2b and ribavirin. *J Viral Hepat* 2007;14:396-403.
 31. Taylor MW, Tsukahara T, Brodsky L, et al. Changes in gene expression during pegylated interferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C virus distinguish responders from nonresponders to antiviral therapy. *J Virol* 2007;81:3391-3401.
 32. Feld JJ, Nanda S, Huang Y, et al. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology* 2007;46:1548-1563.

Received August 30, 2007. Accepted January 31, 2008.

Address requests for reprints to: Namiki Izumi, MD, PhD, Chief, Department of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, 1-26-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180-8610, Japan. e-mail: nizumi@musashino.jrc.or.jp; fax: (81) 422-32-9551.

Supported by grants from the Miyakawa Memorial Research Foundation; the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; and the Japanese Ministry of Welfare, Health and Labor.

Financial disclosures: The authors who participated in this study have had no affiliation with the manufacturers of the drugs involved either in the past or in present and have not received funding from the manufacturers to conduct this research.

C型肝炎ウイルス (HCV)

急性・慢性 C 型肝炎

平 山 慈 子 泉 並 木

月刊 臨 牀 と 研 究 別 冊

平成 20 年 7 月 発 行

第 85 卷 第 7 号

特集/日常診療に必要なウイルス肝炎の知識と対策

C型肝炎ウイルス(HCV)

急性・慢性 C 型肝炎

平山 慈子 泉 並木

はじめに

わが国のC型肝炎のキャリアは150~200万人と推定されている。C型肝炎ウイルス(HCV)の感染は、慢性肝炎、肝硬変、そして肝細胞癌を引き起こすことが多い。わが国の年間肝細胞癌死亡者数は3万4千人以上であり、肝細胞癌は主要な悪性新生物死亡順位のうち男性で3位、女性で4位を占めており、死亡例のうち80%がHCV感染によるものであり、適切な時期に適切な治療介入を行うことで肝硬変への進展を予防し、肝発癌を抑制することが大切である。

I. C 型急性肝炎

C型急性肝炎とはHCVの初感染により肝細胞障害を生じる疾患である。2~28週の潜伏期間を経て、全身倦怠感、食欲不振、悪心・嘔吐、右季肋部痛、上腹部膨満感、肝腫大などを生じる。しかし一般的にA型やB型急性肝炎と比べて症状が軽いため、自覚症状がないことも多い。

1. 疫学と感染経路

感染症発生動向調査によると、C型急性肝炎の発生数は2004年が43例、2005年が57例であり、急性ウイルス肝炎のうち約20%をHCVが占めている。ちなみにC型急性ウイルス肝炎の報告基準は、症状や所見からその疾患が疑われ、かつ、HCV抗体陰性・HCV-RNAまたはHCVコア抗原陽性か、ペア血清でHCV抗体価の明らかな上昇を認めたものとされている。

感染経路としては輸血、観血的医療行為、針刺し事故、経静脈的薬物乱用、刺青、針治療などが挙げられるが、1999年に輸血用血液のスクリーニングに精度の高い核酸増幅検査(NAT)が導入されてからは、輸血による新たなHCV感染はほとんど発生していないと考えられている。現在で

武蔵野赤十字病院消化器科

は針刺し事故、医療行為に関連する感染が約半数を占めており、医療従事者の感染対策が必要である。

母子感染率は9.7%程度と考えられているが、HCV-RNA陽性となった児のうち約30%は3歳ごろまでにウイルスは自然消失する。母子感染のハイリスクとしては、母体のHCV高ウイルス量、母体のHIV混合感染などが挙げられているが、母子感染の予防法は現在までのところ確立されていない。

性行為感染症(STD)としての感染はB型肝炎ウイルス(HBV)などと比べると低率だが、少ないながらも夫婦間感染の報告もあり、体液(特に血液)の取り扱いに注意するよう指導する必要がある。

2. 検査

C型肝炎ではIgG型抗体を測定するHCV抗体検査がスクリーニングとして有用である。HCV抗体が陽性となった場合、HCV感染状態であるキャリア、過去にHCVに感染したが現在はウイルスが排除されている既感染、検査の偽陽性、の3つの可能性が考えられる。HCVキャリアと既感染を区別するためには、抗体価の測定(一般に既感染では抗体価が低い)やHCV-RNAの検出が有用である。またHCV抗体が陽性化するのには感染後1~3ヵ月してからなので、急性肝炎の早期診断のためにはHCV-RNAの測定が必要である。C型急性肝炎とHCVキャリアからの発症を区別するためには、経時的なHCV抗体価の測定が有用である(C型急性肝炎では経過とともに抗体価が上昇する)。

3. 自然経過と治療

C型急性肝炎を発症した場合、20~40%ではウイルスが陰性化し肝機能も正常化するが、残りの60~80%の人はHCVキャリアとなり、多くは慢性肝炎へ移行し20~35年の経過で肝硬変に至る。

症状が軽度の場合は特に治療は必要とせず、食欲不振などが強ければ補液などの対症療法が中心となる。重症化することはまれだが高率に慢性化する。慢性化の兆候が認められればIFNによる抗ウイルス療法を検討する必要がある。トランスアミナーゼが2峰性または多峰性に推移する症例や、6ヵ月を超えて肝機能障害が遷延する症例では慢性化しやすいと考えられている。

インターフェロン療法をいつ開始するかに関しては、早期にIFN療法を始めて98%という高いウイルス学的著効(SVR)を得られたという報告がある一方で、4週間程度の観察期間をもうけることでウイルスが自然消失する症例を除いて治療が可能であったという報告もあり、コンセンサスは得られていない。感染から6ヵ月以内にIFN治療を行うことで、90%以上でウイルスを駆除できる。

II. C 型 慢性 肝 炎

C型慢性肝炎はHCVの慢性持続性感染により肝組織に壊死炎症反応が起こる疾患である。わが国のHCV抗体陽性率は1.4~1.7%であり、60歳以上の高齢者ではより抗体陽性率が高い。

1. 疫学と自然経過

HCVの初感染では60~80%が持続感染化し、高率に慢性肝炎となる。自然治癒はまれであり(ウイルスの自然排除率は年率0.5%)、20~35年の経過で肝硬変へ進展し、肝線維化の進展に伴い高率に肝細胞癌を合併するようになる。ウイルスが排除されにくい機序としては、ウイルスの変異速度が速いため宿主の免疫応答から逃れやすいこと、宿主の樹状細胞の機能が低下している場合にウイルスが排除されにくいことなどが報告されている。肝線維化の各ステージごとの年率発癌率は、F1で約0.5%、F2で約1.5%、F3で約5%、F4(肝硬変)で約8%である。肝線維化進行速度には、ウイルスの型やウイルス量は影響しないが、ALT値の高さや肝機能異常の持続期間が強く関連する。また年齢がすすむほど肝線維化の進行速度は加速する。

HCVキャリアが全員肝硬変へ進展するわけではなく、20年後に肝硬変に進展するのは全体の約10~15%であり、最終的に肝不全や肝細胞癌により死亡するのは20%前後だと推定されている。肝病変進展に関与する因子としては、高齢者・高齢初感染、男性、肥満・糖尿病合併、飲酒、持続的

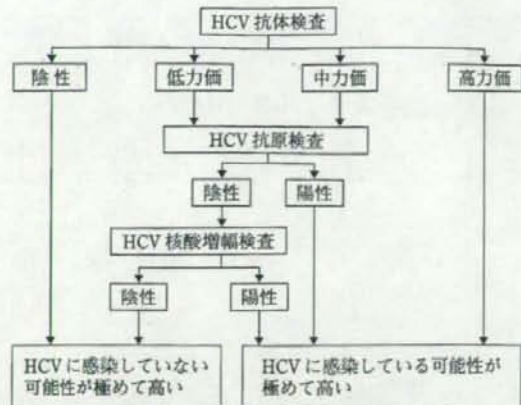


図1 肝炎ウイルス検診実施要綱

ALT高値、肝壊死所見高度、肝脂肪化、HBV感染合併、HIV感染合併、免疫抑制状態などが挙げられる。

2. 検 査

C型肝炎は自覚症状に乏しく、気づかないうちに慢性肝炎を発症している可能性がある。そのため、節目検診等でのスクリーニング検査が必須となってくる(図1)。特に、過去に肝機能異常を指摘されたことのある人、頻回の経皮的暴露の危険のある人、1992年以前に輸血や大きな手術を受けた人、1994年以前にフィブリノゲン製剤を投与されたことのある人、透析患者、HIV感染者、HCV感染者の家族などのハイリスク者では、積極的にスクリーニング検査を行うべきである。スクリーニングにはHCV抗体検査と血清ALT値が用いられる。

HCV抗体が陽性になった場合は、HCVコア抗原検査やHCV-RNA検査(アンプリコアHCV定性法)を行う。それによりHCV感染が確認されたら、(1)ウイルス学的検査、(2)肝病変進展の評価、(3)肝細胞癌合併の有無などの検査、(4)肝外病変の評価を行い、その結果に応じた治療方針を検討する必要がある。(1)として、HCV-RNA量、Genotype(またはSerotype)、NS5A:IFN感受性決定領域(ISDR)の変異数などを調べ、それに応じて抗ウイルス療法の種類や治療期間の決定を行う。IFN感受性は1b<2b<2aであり、ISDR変異数が多いほどIFNへの感受性が良好である。HCVの定量法としては、RT-PCR法を用いたアンプリコアHCVモニター法(オリジナル法)、高ウイルス領域の定量性に優れたアンプリ

コア HCV モニター法 (ハイレンジ法) などが用いられてきたが、アンプリコア HCV 定性法よりも感度が高く測定範囲も極めて広い TaqManHCV 測定法が臨床応用され始め、今後は広く用いられるようになると考えられる。HCV コア抗原検査は、感度はアンプリコア HCV モニター法に若干劣るものの、より高ウイルス量まで定量性に優れ、簡便に短時間で結果を得ることのできる定量法である。

(2)では、肝硬変を示唆する検査所見として AST>ALT, Alb 低値, PT%低下, 血小板数減少などが挙げられる。特に血小板数は肝線維化進行度と相関することが多く、F1 で約18万, F2 で約15万, F3 で約13万, F4 で約10万/ μ l 以下であるが、個人差も大きいためゴールドスタンダードはやはり肝生検である。ALT >30 IU/l と活動性の慢性肝炎が疑われる症例や、血小板低値で肝線維化が予測される症例、IFN 療法を考慮する症例では肝生検を検討すべきである。

(3)では、腫瘍マーカーと、腹部超音波検査などの肝画像検査によりスクリーニングを行う必要がある。その結果肝細胞癌が疑われれば、dynamicCT/MRI, SPIO-MRI, 造影超音波検査などのさらに進んだ検査を行い、場合によってはCTHA/CTAP, 肝腫瘍生検なども検討する。

(4)肝外合併症としては以下の表のようなものがあり(表1), HCV 感染に伴う免疫異常と関連して発症すると考えられている。IFN などによる抗ウイルス療法は、腎障害や皮膚病変を改善する可能性がある一方で、自己免疫性疾患、甲状腺疾患、血液疾患などは増悪させる可能性もあるため、治療方針決定の際に肝外病変の状態も考慮する必要がある。

3. 治療

C型慢性肝炎の治療のゴールは、肝硬変進展の防止と肝発癌の抑制により肝病変関連死を減少させることである。これを達成するための第一目標としてHCVの駆除が挙げられる。B型慢性肝炎と異なり、C型慢性肝炎では治療により体内から完全にウイルスを駆除しうる。一方HCV駆除不能例における第二の治療目標は、ALT値を持続低値に抑えることで肝線維化の進行を抑え、肝発癌を抑制することである。

C型慢性肝炎の治療はIFN療法が中心となる。HCVのGenotype, ウイルス量, 初回治療か否か, などに基づき厚生労働省治療標準化研究班からC

表1 HCV感染における肝外合併病変

腎病変	<ul style="list-style-type: none"> • 膜性腎症 • 膜性増殖性糸球体腎炎 • メサンギウム増殖性糸球体腎炎
血液病変	<ul style="list-style-type: none"> • 自己免疫性血小板減少性紫斑病 • 混合性クリオグロブリン血症 • 非ホジキンリンパ腫 • 単クローン性γグロブリン血症
皮膚病変	<ul style="list-style-type: none"> • 扁平苔癬 • 晩発性皮膚ポルフィリン症
その他	<ul style="list-style-type: none"> • 甲状腺機能異常 • シェーグレン症候群 • 特発性肺線維症 • 心筋炎 • ぶどう膜炎, 強膜炎

型慢性肝炎の治療ガイドラインが発表されている(本稿では詳細は割愛する)。

IFNには大きく分けてIFN α とIFN β があり、IFN α には天然型と遺伝子組み換え型(IFN α 2a, IFN α 2b, コンセンサスIFN)が、IFN β には天然型がある。IFN β は静注または点滴静注で投与され、肝硬変(Genotype1b高ウイルス量以外)にも唯一保険適応のあるIFNである。精神・神経系の副作用や脱毛の副作用が α 製剤よりも少ないため、高齢者や精神疾患の既往のある患者にも比較的使いやすいが、蛋白尿の出現頻度が高い。

IFN α 製剤はIFN単独療法、リバビリン(RBV)との併用療法どちらにも保険適応がある。また遺伝子組み換え型のIFN α 2a, α 2bにポリエチレングリコール(PEG)を結合させたPEG-IFN製剤も開発されている。PEG-IFNはベグ化により蛋白分解酵素による分解や宿主の免疫系からの認識・排除機構から守られ、週一回投与でも良好な血中濃度を得ることが可能となった。これによりインフルエンザ様症状などの自覚的な副作用が軽減した。

RBVはプリン体系核酸アナログ誘導体で、DNAウイルス・RNAウイルスともに広い抗ウイルス活性を持つ。作用機序として、ウイルスのRNA依存性RNAポリメラーゼを阻害することでウイルスの複製を抑える、ウイルスに誤った変異をおこさせることによりウイルスを抑制する、宿主の免疫系をTh1優位に誘導することによりウイルス排除を促進することなどが考えられている。RBV単独では有効性を発揮せず、IFNと併用される。主に腎臓から排泄されるため、腎機能障害のある人、潜在的腎機能低下のある高齢者な

どでは血中濃度が上昇する危険があり注意が必要である。Ccr 50ml/min 以下、妊婦・授乳婦では禁忌である。

IFN療法は、HCV感染者でALTが異常値を示す全ての成人が対象となるが、肝硬変進展・肝発癌のリスクと治療の効果・副作用を総合的に判断して治療方針を決定する必要がある。一般的にIFN療法が強く推奨される症例としては、18歳以上65歳未満、ALT >30 IU/l、F2以上の線維化を認める症例、今まで治療を受けたことのない症例などが挙げられる。18歳未満や65歳以上の高齢者、肝機能正常が持続しているHCVキャリア、前回治療無効例、精神疾患・腎機能障害やその既往がある症例、血球減少例、高血圧・糖尿病合併例などでは、効果よりも副作用の危険が上回ることがあり、慎重に適応を検討する必要がある。

IFN療法の効果判定は、治療終了後24週の時点でHCV-RNA定性検査が陰性であるものをウイルス学的著効(SVR)とする。また治療終了後24週の時点でHCV-RNA陽性の症例のうち、治療中にはウイルスが陰性化していたものを再燃、治療中もウイルスが持続陽性だったものを無効とする。治療終了後24週以上ALT値が正常化しているものは生化学的著効(BR)とする。

IFN療法の治療効果に寄与する因子としては、ウイルスのGenotype (1b<2b<2a)、HCV-RNA量、肝線維化進展度(非進行例ほど効きやすい)、年齢(若年ほど効きやすい)、性別(IFN単独では女性、PEG-IFN+RBV併用療法では男性のほうが効きやすい)などが挙げられる。またPEG-IFN+RBV併用療法では治療開始後のウイルス動態が治療効果を予測する上で極めて重要である。例えば治療開始8週目までにHCV-RNA陰性化が達成された症例のSVR率は約80%、12週目までにHCV-RNA陰性化が達成された症例では

SVR率は約70%、逆に24週目までにHCV-RNAが陰性化しない症例や12週の時点でHCV-RNAが2log以上減少していない症例ではSVRはほとんど期待できない。そこでPEG-IFN+RBV併用療法中はウイルス動態をモニターし、12週の時点でHCV-RNA量が2log以上減少しない症例・24週目までにHCV-RNAが陰性化しない症例では、副作用や費用対効果の観点から治療を中止したり、肝炎進行抑制・肝発癌抑制を目的としたIFN単独長期療法への切り替えを検討することがある。また治療開始後13~24週の間でHCV-RNAが陰性化する症例では、治療期間を72週に延長することでSVR率が上昇する可能性がある。

お わ り に

近年C型肝炎の治療は、PEG-IFN+RBV併用療法などの出現により大きく進歩した。しかしながら我が国ではIFNへの反応性の不良なGenotype1bが多く、また患者層の高齢化などにより難治性の症例が増えている。高齢者では副作用も生じやすく、治療を完遂するためには適切な時期に投与量を減量するなどの調整が必要となる。今後は治療中のウイルス動態に基づいて治療期間等を調節するなど、個々の患者に応じた治療の工夫が重要になってくると考えられる。

文 献

- 1) Jaeckel, E., Cornberg, M., Wedemeyer, H. et al.: Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med*, 345(20): 1452-1457, 2001.
- 2) Hfer, H., Watkins-Riedel, T., Janata, O. et al.: Spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C can be predicted by repeated measurements of serum viral load. *Hepatology*, 37(1): 69-64, 2003.
- 3) 八橋弘: 肝癌撲滅をめざしたウイルス肝炎の治療戦略. *Medical Practice*, vol.24, No.4, p594-601, 2007.
- 4) 白木和夫: C型肝炎ウイルス等の母子感染防止に関する研究. 平成15年度厚生労働科学研究報告書, p1-13, 2004.
- 5) 肝臓病診療ゴールデンハンドブック. 2007. 10. 25.
- 6) 白鳥康史: ウイルス肝炎update. 2005. 6. 10.

I 岩崎 学

成蹊大学工学部 情報学科

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
分担研究報告書

データマイニング手法の統計的性質に関する研究

分担研究者 岩崎 学 成蹊大学理工学部教授

研究要旨：本研究の研究課題は「データマイニング手法を用いた効果的な治療方法に関する研究」であり、私の研究分担はデータマイニング手法の統計的性質の研究ならびに医療データへの適用法の適切性の保証である。データマイニング手法にはいくつかのものがあるが、本研究では治療効果の予測に分類木 (decision tree) を用いていることから、モデル作成データから構成した分類木の治療効果の予測可能性を検証データによって評価した際の統計的な性質に関する研究を行なった。その結果理想的な状況であってもいわゆる平均への回帰現象が観測されることが分かり、それを考慮したうえでの評価が必要であることが示された。

A. 研究目的

従来の統計分析手法に加え、近年では特に大規模データの分析法としてデータマイニングの手法が実用に供されている。データマイニングでは、極めて大量のデータを扱うことから、古典的な統計解析で多く用いられてきた推定や検定にはあまり重きが置かれていない。本研究では1500例を超える臨床成績を得ていて、臨床研究としては極めて大規模であるというものの、数百万例が普通のデータマイニングの対象に比べるとデータ数は少なく、統計的な推測の議論が必要となる。

ここではデータマイニング手法のうち本研究で用いられた分類木に関する統計的評価法を考察した。

B. 研究方法

本研究では、全体のデータをモデル作成用と検証用に2:1の割合で分け、モデル作成用データによって求められたモデルに

対し、検証用のデータを適用してモデルのパフォーマンスを調べている。ある背景因子 x_i を持つ患者グループの真の治癒率が p_i であるとする。モデル作成用データにより構築したモデルから推定した治癒率を \hat{p}_i とし、検証用データでの治癒率を \tilde{p}_i としたとき、理想的には $\tilde{p}_i = \hat{p}_i$ となることが望ましい。ここではそれを実際のデータで評価することに加え、 \hat{p}_i と \tilde{p}_i との関係を経験的な観点から考察した。

(倫理面への配慮)

データはすべて匿名化され、個人の識別は不可能であると同時に、概ね集計ベースのみにてデータを取り扱っている。

C. 研究結果

本研究では、目的変数を数種類設定し、専門医家向けおよび一般医家向けのモデルを構築し、それぞれのモデルのパフォーマンスを評価している。ここではそれらのうちの2つのみのグラフを図1として示す。

横軸 (x-軸) がモデル作成用データから推定された治癒率 \hat{p}_i , 縦軸 (y-軸) が検証用データによって得られた治癒率 \bar{p}_i である。



図1 治癒率の予測

前項 B で述べたように, (\hat{p}_i, \bar{p}_i) のプロットは $y = x$ の直線上に乗っていることが望ましい。図1の第1グラフではプロットがほぼ直線状であるに対し, 第2グラフでは若干のばらつきが見られる。また, 各図には回帰直線が引かれているが, 回帰直線の傾きは1よりも小さい。すなわち, 治癒率80%と予測されても実際の治癒率は80%に満たないことを意味している。このことは, 構築されたモデルのパフォーマンスが悪いことを意味していない。

この種の評価にはいわゆる「平均への回帰」(regression to the mean) の現象が観測される。平均への回帰は処置前後データの解析の際に見られる現象であり (たとえば岩崎 (2002) を参照), 2変量正規分布のような連続変量でなく, 二項分布はポアソン分布のようなカウントデータでも同じく観測されることが示されている (たとえば岩崎・河田 (2007) など)。

処置前後データではなく本研究のようなモデルの検証における平均への回帰についてこれまでの研究成果はほとんど見られない。そこで今回は, モデルが死んでであるという理想的な状況下でどの程度平均への回帰が観測されるかをシミュレーションベースで検討した。図2はその1例である。

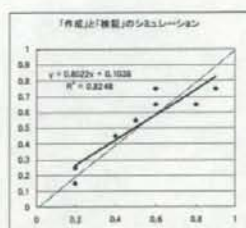


図2 シミュレーション結果

D. 考察

図2からも分かるようにモデルが真であってもなお回帰直線の傾きは1よりも小さく, 平均への回帰が観測されることが分かった。

E. 結論

本年度は問題の所在を明確にすることができた。次年度以降, モデルの推定精度を加味し, 平均への回帰を考慮したうえでのモデルのパフォーマンスの評価法について研究していきたい。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

参考文献

- 岩崎 学 (2002) 「処置前-処置後」データの解析と平均への回帰. 行動計量学, 29, 247-273.
- 岩崎 学・河田祐一 (2007) 処置前後研究における平均への回帰とその周辺. 日本統計学会誌シリーズJ, 36, 2, 131-145.

G. 研究発表

今回の研究内容については特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

II 黒崎 雅之

武蔵野赤十字病院 消化器科

厚生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） データマイニング手法を用いた効果的なC型肝炎治療法に関する研究

ペグインターフェロンとリバビリン併用における治療アルゴリズムの検証

分担研究者 黒崎雅之 武蔵野赤十字病院・消化器科副部長

研究要旨:データマイニング解析を用いてウイルス側要因、宿主側要因、治療要因を統合的に組み入れたPEG-IFN・RBV 併用療法の効果予測モデルを作成した。班員施設から収集した情報をもとに、治療効果や副作用発現率と関連すると考えられる薬剤投与量、HCV 陰性化時期、HCV2log 減少時期、血球減少量を週毎に算出し、分析用の共通データベースを構築した。これをもとにウイルス学的著効(SVR)、ウイルス学的無効(NVR)、治療中の血球減少を予測するアルゴリズムを構築した。67%の症例を用いてモデルを作成し、残りの33%の症例で妥当性を検証し、作成したモデルに再現性があることを確認した。また武蔵野赤十字病院の症例については、診療情報データベース上のすべての検査データをダウンロードし、解析に投入した。早期 HCV 陰性化と、HCV 陰性化例からの再燃を目的変数として解析を行い、肝脂肪化、GGT、LDL-Cholesterol、血糖値など従来は注目されなかった因子が早期 HCV 陰性化と関連することが明らかとなり、また治療終了後のHCV 再燃には、年齢、薬剤投与量、NS5A 遺伝子変異が関連することを示した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法により、1b型高ウイルス量症例においても約半数でのウイルス学的著効(SVR)が得られるようになった。しかし、同治療法は副作用や経済的負担も少なくなく、治療効果を予測し、個々の患者状態に応じた適切な治療方法を選択することが重要である。しかし、現時点では治療前の効果予測は困難である。本研究ではデータマイニング解析を用いることにより、従来の統計手法では困難であった治療効果に関連するウイルス、生体、治療の要因に重み付けをした解析を行い、これらを統合的に組み入れた治療効果予測モデルを作成し、さらに作成したモデルの普遍性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

(1)全体研究:班員施設からペグインターフェロン・リバビリン併用療法を行なったC型肝炎患者のデータを収集し、治療効果や副作用発現率と関連すると考えられる薬剤投与量、HCV 陰性化時期、HCV2log 減少時期、血球減少量を週毎に算出して、分析用の共通データベースを構築した。これら算出した項目と、収集したすべての臨床データを説明変数とし、ウイルス学的著効(SVR)、ウイルス学的無効(NVR)などの治療効果、および治療中の高度血球減少などの副作用発現を目的変数として SPSS Clementine ソフトウェアを用いてデータマイニング解析を行ない、目的変数を効率的に判別する説明変数を情報理論に基づき逐次的に探索し、判別モデルを構築した。判別の効率性については、判別効率曲線を用いて評価した。収集した1530例のうち、治療効果判定が可能であった1276例を対象とし、乱数表を用いて67%の症例を抽出してモデル作成し、残りの33%の症例を用いて妥当性を検証した。

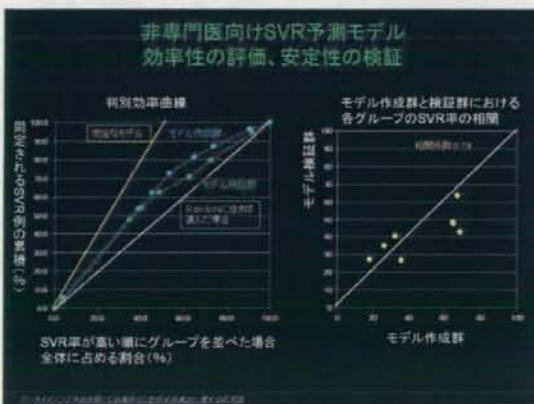
(2)個別研究:全体研究では、班員施設から収集できる情報量に限りがある。より網羅的な解析を行うために、武蔵野赤十字病院の256症例に限定し、患者背景、肝組織所見、および診療情報データベース上のすべての検査データをダウンロードしデータマイニング解析を行った。

(倫理面への配慮)

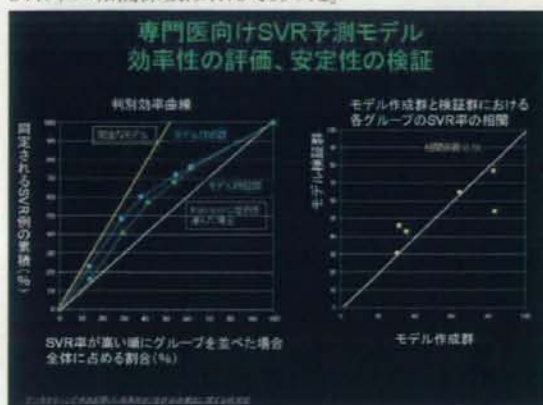
ヒトの遺伝子(DNA)に係わる実験・解析は行わない。臨床データのデータベース構築においては、氏名、年齢など個人情報と連結可能匿名化する。臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新GCPに遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて同意書を得ている。本研究の遂行においては各研究施設において必要な申請を行い、各種倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

(1)-1 一般検査成績によるSVR予測モデルの構築と検証:一般血液検査のうち血小板、年齢、HCV RNA量、性別、AFP、GGTを説明因子とするモデルが作成された(研究代表者報告参照)。モデル作成群と検証群における判別効率曲線は同様の傾向を示し、モデル作成群と検証群の予測SVR率の相関係数は0.79であった



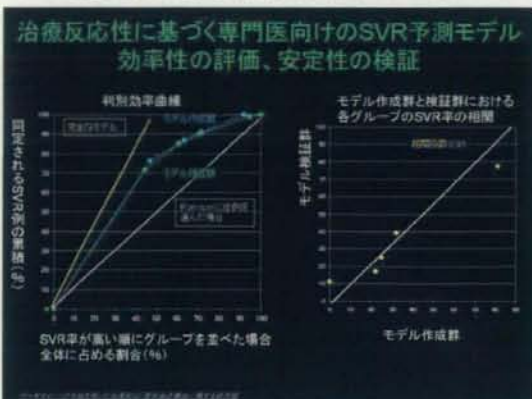
(1)-2 遺伝子変異検査、肝生検を加味したSVR予測モデルの構築と検証: NS5A-ISDR変異数、Core70変異、年齢、LDL-Cholを説明因子とするモデルが作成された(研究代表者報告参照)。モデル作成群と検証群における判別効率曲線は同様の傾向を示し、モデル作成群と検証群予測SVR率の相関係数は0.79であった。



(1)-3 治療反応性を含めたSVR予測モデルの構築と検証: 一般検査を用いた解析では、HCV陰性化時期、HCV 2log低下時期、年齢、薬剤投与量、治療期間を説明因子とするモデルが作成された(研究代表者報告参照)。モデル作成群と検証群における判別効率曲線は同様の傾向を示し、モデル作成群と検証群予測SVR率の相関係数は0.91であった。

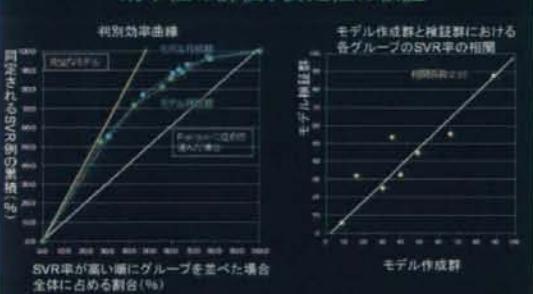
治療反応性を含むモデルの判別効率率は、治療前予測モデルと比較し向上しており、臨床的有用性が高いと考えられた。

遺伝子変異検査、治療反応性を含めたSVR予測モデルでは、HCV陰性化時期、治療期間、Core70、91アミノ酸置換を説明因子とするモデルが作成された(研究代表者報告参照)。モデル作成群と検証群における判別効率曲線は同様の傾向を示し、モデル作成群と検証群の予測SVR率の相関係数(研究代表者報告参照)は0.91であった。

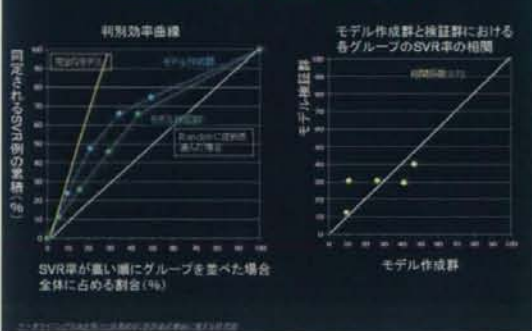


(1)-4 NVR予測モデルの構築と検証: 一般検査成績によるモデルでは、AFP、LDL-cholesterol、GGTを説明因子とするモデルが作成された(研究代表者報告参照)。遺伝子変異検査、肝生検を加味したNVR予測モデル: 肝線維化stage、Core70変異、Core91変異を説明因子とするモデルが作成された(研究代表者報告参照)。モデル作成群と検証群における予測NVR率の相関係数は0.72であった。

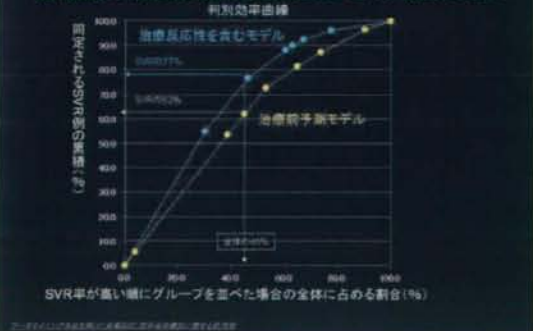
治療反応性に基づく非専門医向けSVR予測モデル
効率性の評価、安定性の検証



NVR予測モデル
効率性の評価、安定性の検証



非専門医向けのSVR予測モデル
治療前予測と治療反応性に基づく予測の比較



(2) 早期(12週以内)HCV陰性化(EVR)予測モデルの構築: 肝脂肪化、GGT、LDL-Cholesterol、血糖値が早期HCV陰性化と関連する因子として抽出され、これらの組み合わせによりEVR率が18-77%の7グループが同定された。全体のEVR率は43%であったが、肝脂肪化が30%以上のグループではEVR率はわずか18%であり、また以下の3グループではEVR率は60%以上であった①肝脂肪化が30%未満、LDL-Cholesterol100以上、年齢50未満、②肝脂肪化が30%未満、LDL-Cholesterol100以上、

年齢 50 以上、GGT40 未満、③肝脂肪化が 30%未満、LDL-Cholesterol100/100 未満、年齢60 未満、血糖値 120 未満。



また 12 週以内に HCV が陰性化したにもかかわらず、治療終了後に HCV が再出現する再燃には、年齢、薬剤投与量、NS5A 遺伝子変異が関連することを示した。

結果は HCV 遺伝子解析に基づく個別化治療スケジュールの構築につながると期待される。

E. 結論

データマイニング解析により、SVR、NVR、再燃を予測するモデルを作成し、その妥当性を検証した。一般検査に HCV 陰性化時期と HCV 遺伝子解析を加味することにより精密な治療効果予測が可能である。今後、本解析結果を前向きに検討することにより、モデルの妥当性を検証することが必要である。データマイニング解析の臨床応用により、EBM に基づく治療効果予測が可能となり、さらには患者状態に応じた個別化治療計画の策定において重要な情報を示すと期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase level are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. *J Hepatol* 2008;48:736-42.
- 2) Asahina Y, Izumi N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Doi F, Tsuchiya K, Nakanishi H, Matsunaga K, Kitamura T, Kurosaki M, Uchihara M, Higaki M, Miyake S. Pharmacokinetics and enhanced PKR response in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *J Viral Hepat* 2007;14:396-403.
- 3) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology* 2008; 134:1396-405.

2. 学会発表

- 1) 黒崎雅之他. 第 44 回日本肝臓学会総会一般演題(優秀演題)長期予後改善を目標とした B 型慢性肝炎の治療:発癌リスク因子のデータマイニング解析および核酸アナログ治療効果の検討 2008.
- 2) 朝比奈靖浩他. 第 44 回日本肝臓学会総会シンポジウム C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における治療成績と難治の要因の検討 2008.
- 3) 朝比奈靖浩他. 第 43 回日本肝臓学会総会シンポジウム C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における難治要因の検討とその対策 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。



D. 考察

データマイニング解析により治療効果を予測するモデルを作成した。データマイニング解析においては、モデル作成対象例のみに当てはまる法則性が強く抽出されてしまう過学習現象が問題となる。したがって普遍性のあるモデルを作成するためには、モデルの妥当性、再現性を別の症例を用いて検証することが重要である。本研究では、症例の 2/3 をランダムに抽出してモデルを作成し、残った 1/3 の症例をモデルにあてはめることにより、妥当性を検証した結果、モデル作成群と検証群における予測率の相関係数は高く、作成したモデルに再現性があることを確認した。

武蔵野赤十字病院の症例に限定して、すべての診療データを説明変数として解析した結果、肝脂肪化、GGT、LDL-Cholesterol、血糖値など従来は注目されなかった因子が早期 HCV 陰性化と関連することが明らかとなった。この結果は、これらの代謝因子を改善することにより治療効果が向上できる可能性を示している。HCV 陰性化後の再燃には、NS5A-ISDR が関連していることを示した。この

The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy[☆]

Masayuki Kurosaki¹, Kotaro Matsunaga¹, Itsuko Hirayama¹, Tomohiro Tanaka¹, Mitsuaki Sato¹, Nobutoshi Komatsu¹, Naoki Umeda¹, Takanori Hosokawa¹, Ken Ueda¹, Kaoru Tsuchiya¹, Hiroyuki Nakanishi¹, Jun Itakura¹, Yasuhiro Asahina¹, Shozo Miyake¹, Nobuyuki Enomoto², Namiki Izumi^{1,*}

¹Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, 1-26-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180-8610, Japan

²First Department of Internal Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan

Background/Aims: Interferon (IFN) therapy leads to regression of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients who achieve a sustained virologic response (SVR), while the beneficial effect is limited in those who fail to do so. The aim of the present study was to define factors associated with progression of fibrosis in patients who do not achieve a SVR.

Methods: Fibrosis staging scores were compared between paired liver biopsies before and after IFN in 97 chronic hepatitis C patients who failed therapy. The mean interval between biopsies was 5.9 years. Factors associated with progression of fibrosis were analyzed.

Results: Fibrosis progressed in 23%, remained unchanged in 47% and regressed in 29%. Steatosis and a high average alanine aminotransferase (ALT) between biopsies were independent factors for progression of fibrosis with risk ratios of 5.53 and 4.48, respectively. Incidence and yearly rate of progression of fibrosis was 64% and 0.22 ± 0.29 fibrosis units per year in those with both risk factors compared to 8% and -0.04 ± 0.17 fibrosis units per year in those negative for both factors.

Conclusions: Hepatic steatosis and elevated ALT levels are risk factors for progression of fibrosis in chronic hepatitis C patients who fail to achieve a SVR to IFN therapy and therefore may be therapeutic targets to halt the potentially progressive disease.

© 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Steatosis; ALT; Fibrosis

Received 20 July 2007; received in revised form 8 October 2007; accepted 17 December 2007; available online 26 February 2008

Associate Editor: J.G. McHutchison

* The authors who have taken part in the research of this paper declared that they do not have a relationship with the manufacturers of the drug involved either in the past or present and they did not receive funding from the manufacturers to carry out their research. They did not receive funding from any source to carry out this study.

* Corresponding author. Tel.: +81 422 32 3111; fax: +81 422 32 9551.

E-mail address: nizumi@musashino.jrc.or.jp (N. Izumi).

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease worldwide. Mortality associated with HCV infection results from the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, which now is the leading indication for liver transplantation [1]. Treatment with interferon (IFN), alone or in combination with ribavirin (RBV), can eradicate HCV infection in some patients, leading to sustained nor-

malization of liver function, improvement of hepatic inflammation and fibrosis and a decreased risk of the development of hepatocellular carcinoma [2,3]. The problem is that only 50% of patients achieve a sustained virological response (SVR) to therapy even with the most highly developed regimens of IFN [4,5]. The remaining patients who fail to clear the virus are left with the risk of progressive disease. In order to halt this potentially progressive disease, there is a need to establish an effective target of therapeutic intervention independent of antiviral therapy. Therefore, it is important to define risk factors for the progression of fibrosis among chronic hepatitis C patients who do not achieve a SVR to IFN therapy.

Several factors that may affect the rate of progression of fibrosis have been investigated extensively, including older age at infection, male gender, obesity, heavy alcohol consumption, and a high grade of necroinflammation [6–8]. Several cross-sectional and longitudinal studies suggest that hepatic steatosis, which is a common histological feature of chronic hepatitis C [9], influences the progression of hepatic fibrosis [10–14], while other studies did not find such an association [15–18]. Besides these conflicting results, no study to date has reported the effect of steatosis on longitudinal progression of fibrosis among patients who fail to respond to IFN therapy. Therefore, we studied factors associated with progression of fibrosis in those who failed IFN therapy by comparing paired pre-treatment and post-treatment liver biopsies.

2. Methods

2.1. Patients

The aim of the study was to identify risk factors associated with progression of fibrosis in chronic hepatitis C patients who failed to achieve a SVR to IFN therapy. To be included in this retrospective study, patients had to have undergone liver biopsy before and after therapy, been treated with IFN and not achieved a SVR. Patients with alcohol consumption of more than 20 g per day, co-infected with HBV or HIV, and those with another known aetiology of liver disease, such as autoimmune hepatitis or metabolic disorders, were excluded. A database of patients who had undergone liver biopsy at Musashino Red Cross Hospital between 1990 and 2004 was reviewed retrospectively and a total of 1241 chronic hepatitis C patients treated with IFN were identified; of these, 407 had a SVR and 834 had not achieved a SVR. Among those with treatment failure, 104 fulfilled the above criteria but seven patients with cirrhosis before treatment were excluded because the endpoint of the study was progression of fibrosis. Therefore, this study cohort consisted of 97 patients. In these patients, second liver biopsies were performed before the second course of IFN therapy. Otherwise, there were no standardized indications for the second liver biopsy which may be the limitation of our study. Demographic characteristics of patients at the time of initial biopsy are shown in Table 1. The time between the paired biopsies was 5.9 years on average, with a range of 1.2–11.6 years. The median interval between first biopsy and IFN therapy was 3 days (range 2–93 days), and that between completion of IFN therapy and second biopsy was 5.4 years (range 0.8–11.2 years). Laboratory tests were performed monthly or bimonthly in all patients and all measurements were taken at our single hospital.

Table 1
Demographic characteristics of patients

Number of patients	97
Age (years)	52 ± 9
Gender: male/female	50/47
BMI (kg/m ²)	23.9 ± 3.2 (median 24.0, range 19–33)
BMI <25/25–30/30 ≤ (kg/m ²)	55/37/5
<i>Route of transmission</i>	
Blood transfusion/unknown	38/59
Duration of infection (years)	30.4 ± 9.2 (median 33.5, range 3–48)
<i>Genotype 1b/2a/2b</i>	
Serum HCV-RNA (Meq/ml)	85/4/8
Pretreatment AST (IU/l)	7.7 ± 9.7
Pretreatment ALT (IU/l)	73 ± 40
Pretreatment GGT (IU/l)	104 ± 69
<i>Histological variables at first biopsy</i>	
Stage of fibrosis 1/2/3	33/38/26
Grade of activity 0/1/2/3	15/36/41/5
Grade of steatosis 0/1/2/3	21/37/25/14
Size of steatosis macro/micro/mixed	16/17/64
Localization of steatosis centrilobular/diffuse	3/94

BMI, body mass index; AST, aspartate aminotransferase, normal range is 7–38 IU; ALT, alanine aminotransferase, normal range is 4–43 IU/l; GGT, gamma-glutamyltransferase, normal range is 0–73 IU/l; macro, macro-vesicular steatosis; micro, micro-vesicular steatosis.

2.2. Histological evaluation

Median length of biopsy specimen and number of portal tracts were 13.0 mm (range 10–40 mm) and 12 (range 6–34). All liver biopsy specimens were evaluated separately by three independent pathologists who were blinded to the clinical data. If there was discordance, the scores assigned by two pathologists were used for the analysis. Fibrosis and activity were scored according to the METAVIR scoring system [19]. Fibrosis was staged on a scale of 0–4: F0 (no fibrosis), F1 (mild fibrosis: portal fibrosis without septa), F2 (moderate fibrosis: few septa), F3 (severe fibrosis: numerous septa without cirrhosis) and F4 (cirrhosis). Activity of necroinflammation was graded on a scale of 0–3: A0 (no activity), A1 (mild activity), A2 (moderate activity) and A3 (severe activity). Percentage of steatosis was quantified by determining the average proportion of hepatocytes affected by steatosis and was graded on a scale of 0–3: grade 0 (no steatosis), grade 1 (0–9%), grade 2 (10–29%), and grade 3 (over 30%). Size of steatosis was categorized into micro-vesicular, macro-vesicular and mixed types. Localization of steatosis was categorized into either centrilobular or diffuse pattern. Definition of changes in the grade of steatosis was as follows: worsening as 1 point or more increase, improvement as 1 point or more decrease, and stability as no change.

2.3. Changes in fibrosis-staging score overtime

Changes in progression of fibrosis were defined as follows: progression of fibrosis was defined as a 1 point or more increase, regression as a 1 point or more decrease and stability as no change in the METAVIR fibrosis-staging score. In addition, because the time between paired biopsies was variable, the yearly rate of progression of fibrosis was calculated as the change in fibrosis-staging score divided by the time between paired biopsies, as originally described by Poynard et al. [6].

2.4. Statistical analysis

The STAT View software package was used for statistical analysis. Categorical data were analyzed using the Fisher's exact test. Continuous variables were compared with the Student's *t* test. Variables that were statistically significant in univariate analysis were included in multivariate analysis using logistic regression analysis. The Kaplan–Meier method and log-rank test were used to analyze the time to occurrence of fibrosis progression. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Factors associated with the initial stage of fibrosis (cross-sectional study)

All three pathologists assigned the same score in 85% of patients for fibrosis staging and 95% of patients for steatosis-grading. In cases with discordance, at least two pathologists assigned the same score. The stage of fibrosis in the initial liver biopsy was F1 in 33, F2 in 38 and F3 in 26 patients. Various clinical factors were analyzed in association with the advanced stage of fibrosis. As a result, the presence of F3 fibrosis was associated with older age, (51 ± 9 in F1–2 vs. 55 ± 9 in F3, $p = 0.03$), higher grade of histological activity (A2–3 was 35% in F1–2 vs. 84% in F3, $p = 0.0001$) and higher grade of steatosis (steatosis grade 2–3 was 34% in F1–2 vs. 58% in F3, $p = 0.04$).

The grade of steatosis was 0 in 21, 1 in 37, 2 in 25 and 3 in 14 patients. A higher grade of steatosis was associated with female gender (the male/female ratio was 35/23 in grade 0–1 vs. 15/24 in grade 2–3, $p = 0.04$), increased BMI (BMI over 25 kg/m^2 was 31% in grade 0–1 vs. 62% in grade 2–3, $p = 0.006$), and higher grade of histological activity (A2–3 was 38% in grade 0–1 vs. 62% in grade 2–3, $p = 0.03$). Multivariate logistic regression analysis revealed that increased BMI and female gender were independent factors associated with a high grade of steatosis (Table 2).

Table 2
Multivariate logistic regression analysis of factors associated with hepatic steatosis

	Odds	95% C.I.	<i>p</i> Value
BMI			
≥25 kg/m ²	4.23	1.63–10.95	0.003
Gender			
Female	2.75	1.06–7.14	0.04
Activity grade			
2–3	2.30	0.85–6.26	0.10
Fibrosis stage			
3	1.63	0.53–4.97	0.39

3.2. Change in fibrosis-staging scores over time (longitudinal study)

Fibrosis staging progressed in 23% (progression by 2 points in 5% and 1 point in 18%), remained unchanged in 47% and regressed in 29% (regression by 2 points in 2% and 1 point in 27%). At first liver biopsy, laparoscopy was performed in 73 patients and the presence of cirrhosis (F4) was carefully excluded. In another 24 patients, the possibility of mis-diagnosis of F4 as F3 remains. However, the incidence of fibrosis progression did not differ according to the initial stage of fibrosis (21.2% in F1, 26.3% in F2 and 19.2% in F3, $p = 0.78$) which indicates that misdiagnosis of F4 as F3 at initial biopsy is unlikely.

Among various factors, as shown in Table 3, a higher grade of steatosis, higher levels of ALT and AST (average value for the period between the paired liver biopsies) were associated with progression of fibrosis. Since there was significant correlation between ALT and AST levels ($r = 0.684$, $p < 0.0001$), these two variables could not be analyzed together in multivariate analysis.

Table 3
Factors associated with the progression of fibrosis over time

	Progression <i>n</i> = 22	Non- progression <i>n</i> = 75	<i>p</i> Value
Gender: male/female	9/13	41/34	0.33
Age at biopsy: <60/≥60 years	14/8	59/16	0.17
HCV genotype: 1b/non-1b	19/3	66/9	0.99
BMI: <25/≥25 kg/m ²	11/11	44/31	0.48
Duration of infection (years)	32.1 ± 5.2	29.9 ± 10.0	0.56
<i>Activity on first biopsy</i>			
Grade: 0-1/2-3	8/14	43/32	0.10
<i>Steatosis on first biopsy</i>			
Grade: 0-1/2-3	6/16	52/23	0.001
Size: macro/micro/mixed	4/4/14	12/13/50	0.96
Location: centrilobular/diffuse	1/21	2/73	0.54
<i>Evolution of steatosis</i>			
Worsening/improvement/stable	2/2/18	9/8/58	0.09
Average ALT: <100/≥100 IU/l	13/9	67/8	0.003
Average AST: <75/≥75 IU/l	10/12	61/14	0.002
Interval between biopsies (years)	5.1 ± 3.2	6.2 ± 2.4	0.09
Interval between completion of IFN and second biopsy (years)	4.6 ± 3.2	5.7 ± 2.4	0.10
<i>Treatment regimen</i>			
RBV-/RBV+	22/0	71/4	0.27
<i>Response to IFN</i>			
Relapser/non-responder	16/6	53/22	0.99
<i>Evolution of weight</i>			
Gain/loss/stable	5/8/9	29/21/25	0.38

macro, macro-vesicular steatosis; micro, micro-vesicular steatosis; RBV-, interferon monotherapy; RBV+, interferon plus ribavirin combination therapy.

Duration of infection was determined in 38 patients whose source of infection was blood transfusion.

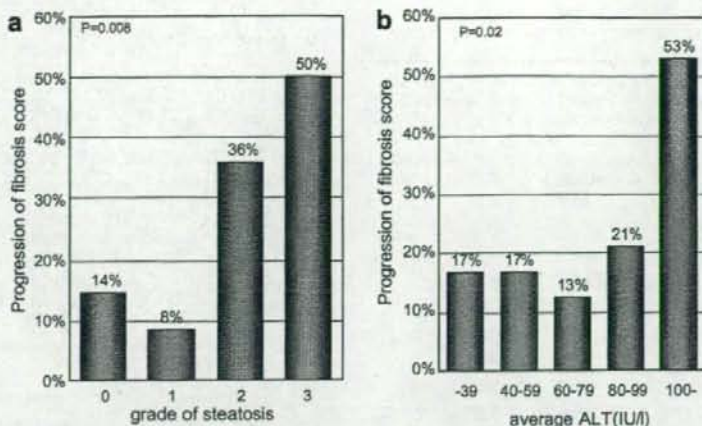


Fig. 1. Progression of fibrosis stage, hepatic steatosis and the average level of ALT. The progression of the fibrosis score over time is illustrated using bar charts. (a) Steatosis grades of 2 or 3 at initial liver biopsy were associated with the increased progression of fibrosis over time. (b) High average ALT levels during the observation period were associated with progression of fibrosis at the threshold of 100 IU/l.

Thus, average level of ALT was used for the following analysis. The probability of progression of fibrosis was 14%, 8%, 36% and 50% in patients with steatosis grades of 0, 1, 2 and 3, respectively ($p = 0.008$), and 17%, 17%, 13%, 21% and 53% in patients with average ALT values of <40, 40–59, 60–79, 80–99 and over 100 IU/l, respectively ($p = 0.02$) (Fig. 1). Multivariate logistic regression analysis revealed that these two were independent risk factors associated with the progression of fibrosis with risk ratios of 5.14 for steatosis ($p = 0.004$) and 5.21 for ALT ($p = 0.01$) (Table 4).

When patients were categorized in terms of these two risk factors, the incidence of progression of fibrosis was as high as 64% in those with both risk factors, compared to 8% in those negative for these factors. Conversely, the incidence of fibrosis regression was only 9% in those with both risk factors, compared to 37% in those negative for these factors ($p = 0.0003$) (Fig. 2).

In order to adjust for the effect of variable intervals between paired biopsies, the yearly rate of progression of fibrosis was calculated as the change in the fibrosis-staging score divided by the time between paired biopsies. The average of all patients was 0.02 ± 0.22 fibrosis units per year. Again, a higher grade of steatosis ($p = 0.004$) and higher average level of ALT

($p = 0.0005$) were associated with a higher rate of progression of fibrosis (Table 5). In addition, the yearly rate of progression of fibrosis was 0.22 ± 0.29 fibrosis units per year in those with both risk factors, 0.12 ± 0.37 in those with elevated ALT alone, 0.05 ± 0.16 in those with steatosis alone and -0.05 ± 0.17 in those negative for these two factors ($p = 0.001$). Time to progression of fibrosis at second biopsy was also analyzed by the Kaplan–Meier method. The cumulative probabilities of progression of fibrosis at five years were 58% in those with both risk factors, 33% in those with elevated ALT alone, 18% in those with steatosis alone and 2% in those negative for these two factors ($p < 0.0001$) (Fig. 3).

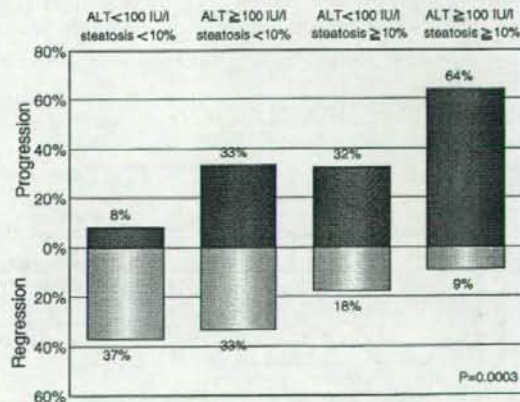


Fig. 2. Evolution of fibrosis stage in terms of risk factors. Patients were categorized into four groups according to the presence or absence of two risk factors. The upper bar chart (dark gray) indicates the progression of fibrosis while the lower bar chart (light gray) indicates the regression of fibrosis.

Table 4
Multivariate logistic regression analysis of factors associated with progression of fibrosis over time

	Odds	95% C.I.	<i>p</i> Value
Steatosis grade			
≥2	5.14	1.67–15.77	0.004
Average ALT			
≥100 IU/l	5.21	1.49–18.20	0.01