

## 特集II C型慢性肝炎のペグインターフェロンとリバビリン療法の治療成績と投与の工夫

# ウイルス変異からみたC型慢性肝炎の治療法\*

坂本 穰\*\*  
榎本 信幸\*\*\*

**Key Words** : interferon, ISDR, amino acid mutations in HCV core region

### はじめに

C型慢性肝炎に対する治療は、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の登場によって格段に進歩し、約70%の症例でウイルス排除(持続的ウイルス陰性化: sustained viral response [SVR])が可能となった。この一方、残りの30%の症例では、いまだ、ウイルス排除がなされず、この難題を克服することが大きな課題となっている。これらインターフェロン反応性の違いについては、これまでに遺伝子型、ウイルス量、遺伝子変異などのウイルス側因子、性、年齢、肝線維化・脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子、また、薬剤の中止・減量、治療期間などの治療因子が関与していることが報告されている。このうち、遺伝子型とウイルス量をはじめとしたウイルス側の因子はもっとも重要であることは明らかで、わが国で70%を占める1b型はとくに治療抵抗性で、とくに、Real time PCR法で5 log IU/ml以上の高ウイルス量例はもっとも難治である。このため、厚生労働省の研究班から示されているガイドライン<sup>1)</sup>では、初回治療の場合、高ウイルス量症例では、もっとも強力

なペグインターフェロン+リバビリン併用療法が推奨され、1b型では48週間、2a/2b型では24週間の治療期間が標準とされている。すなわち、低ウイルス症例では、インターフェロン単独療法で十分に治療可能であり、2a/2b型では、たとえ高ウイルス量であっても、併用療法(24週)をおこなえば、80%以上のSVRが得られるからである。一方、1b型かつ高ウイルス量症例では、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法を48週間行っても、ウイルス排除率は40%程度にとどまるうえ、強力な治療法であるが故の副作用も多く、貧血や鬱症状、間質性肺炎、脳出血など、生命予後にかかわる副作用も多く、治療中の薬剤の中止・減量が治療成績を減弱させている。したがって、インターフェロン療法においては、治療開始前の効果予測が、適応症例の選択や治療期間を含めた治療法の決定には必要不可欠であることはもちろん、治療効果と副作用とのリスク対効果比較や不要な治療抑止などの面からも重要である。また、最近telaprevirをはじめとした新規抗ウイルス剤の開発も進行中で、近い将来の選択肢を見据えた治療選択も可能となる。

### 1b型かつ高ウイルス量症例の治療成績

C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)は

\* Treatment strategy of chronic hepatitis C using mutations in the HCV genome.

\*\* Minoru SAKAMOTO, M.D., Ph.D.: 山梨大学大学院医学工学総合研究部肝疾患地域先端医療システム学(☎409-3898 中央市下河東1110); Advanced and Community Medicine for Liver Disease, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Chuo 409-3898, JAPAN

\*\*\* Nobuyuki ENOMOTO, M.D., Ph.D.: 山梨大学医学部内科学講座第1教室(消化器内科)

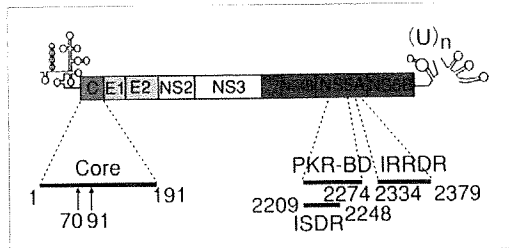


図1 インターフェロン感受性に関連するC型肝炎ウイルスの遺伝子変異

+1本鎖のRNAウイルスであり、ゲノムの両端に非翻訳領域が存在し、中央部には約3,010個のアミノ酸からなる1本のポリ蛋白前駆体をコードするopen reading frameが存在する。この領域にはHCVの構造蛋白(コア、エンベロップ蛋白)とウイルス増殖に必要な種々の酵素をコードする非構造領域(nonstructural region: NS)が存在する。これまで、1b型のHCVのインターフェロン治療の治療効果規定因子として明らかになっているウイルス側の因子として、インターフェロン感受性領域(interferon sensitivity determining region: ISDR)<sup>23</sup>、コアアミノ酸変異<sup>24</sup>、IFN/RBV抵抗性領域(IFN/RBV resistance-determining region: IRRDR)<sup>8</sup>などが報告されている(図1)。

特に、ISDRは、HCVのNS5A領域C末端よりの40アミノ酸(a. a. 2209-2248)領域であり、インターフェロン単独療法の時代に1b型の著効症例と無効症例の全塩基配列の比較から見出されたもので、インターフェロン単独6か月間の治療で、この領域に、標準配列であるHCV-Jとの比較で4個以上のアミノ酸変異がある(mutant type)とSVRになる可能性が高く、1~3個の変異(intermediate type)や変異なし(wild type)では治療効果に乏しいことが報告されている。

そこで、われわれは、山梨大学第1内科と関連施設で組織するY-PERS(Yamanashi PEG-interferon + Ribavirin Study)で集積された1b高ウイルス量症例のうちPEG-IFN $\alpha$  2b(ペグイントロン) + リバビリン併用療法を12か月間行った症例で、治療効果すなわちSVRを予測する因子について多変量解析を行った。この結果、有意な因子は年齢60歳未満、肝線維化(F因子1以下)といった

表1 ペグインターフェロン+リバビリン併用療法48週間の治療に関する因子(多変量解析)

	odds比	95%CI	P	
年齢	<60/ $\geq$ 60	0.255	0.057 ~ 0.886	0.0329
F因子	0 ~ 1/2 ~ 4	0.139	0.034 ~ 0.563	0.0061
ISDR変異数	0 ~ 1/2 ~	164.571	8.458 ~ >999.9	0.0008
コアAA70	Q/R	13.840	2.464 ~ 77.739	0.0028

(n=194)

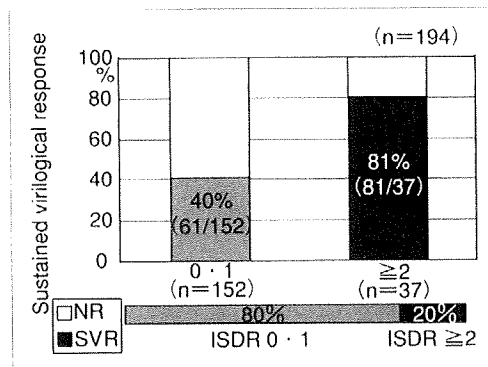


図2 1b型かつ高ウイルス量症例の48週間のペグインターフェロン+リバビリン療法のISDR変異数別SVR率

宿主因子と、「ISDR変異数2個以上」、「コア70番アミノ酸R」のウイルス側因子であり、コア91番アミノ酸や、コア70番と91番の両者変異non-double wild typeは有意な因子としては抽出されなかった。また、統計学的に有意差があるもののうち、もっとも強力な因子は「ISDR変異数2個以上」であった(Odds比164.571)(表1)。とくに、ISDR変異数が2個以上のペグインターフェロン+リバビリン併用48週間治療のSVR率は81%であったが、0ないし1個変異では40%にすぎなかった(図2)。また、ISDRに2個以上の変異があると、コア70番のアミノ酸変異によらず、高率にウイルス排除がなされるために、この群内では、コアアミノ酸変異は有意な因子としては導かれないことが判明した。次に、ISDR変異数0ないし1個の症例に限って、同様に多変量解析を行うと、有意な因子は年齢60歳未満、肝線維化F1以下、T. Chol $\geq$ 160、コア70番アミノ酸Rであり、このうちもっとも重要な因子はコア70番アミノ酸であり(表2)、ここでコア70番アミノ酸変異の有用性が生じてきた。実際のSVR率はISDR変異数0ないし1個の症例で、コア70

表2 ISDR変異数0・1症例におけるペグインターフェロン+リバビリン併用療法48週間の治療に関する因子(多変量解析)

		odds比	95%CI	P
年齢	<60/≥60	0.122	0.023~0.641	0.0129
F因子	0~1/2~4	0.066	0.011~0.407	0.0035
T. Chol	<160/≥160	10.757	1.630~70.990	0.0136
コアAA70	Q/R	49.457	4.499~543.583	0.0014

(n=152)多変量ロジスティック回帰分析.

番アミノ酸がRの場合は58%であり, QないしHの場合は11%であった( $P=0.0006$ ), したがって, 1b型に対する48週間のペグインターフェロン+リバビリン併用療法において, 治療効果予測にもっとも重要なものはISDR変異数であり, 2個以上であれば高いSVR率が期待できるものの, ISDR変異数0ないし1個の場合には, コア70番アミノ酸がRの場合にのみ高いSVR率が期待できることが示された. したがって, 治療効果予測には, まずISDRを測定し, 変異数が0ないし1個の場合にはコア70番のアミノ酸変異を測定することで詳細な治療効果予測が可能であると考えられる. しかも, インターフェロン単独療法でSVRを得るためには4個以上のアミノ酸変異が必要であったが, ペグインターフェロン+リバビリン併用療法においては, 2個以上の変異があれば80%以上の高い確率でSVRを期待できることが明らかになった<sup>9,10</sup>.

### 難治例に対する治療の工夫

今後, telaprevirを含めた新しい治療法により治療効果が格段に向上する可能性はあるが, 現在ただちに可能なことはペグインターフェロン+リバビリン併用療法の治療期間の延長である. 先のガイドラインでも, 「投与開始12週後にHCV RNA量が前値の1/100以下に低下するがHCV RNAがReal time PCR法で陽性で, 36週までに陰性化した例」では, プラス24週(トータル72週間)の治療が推奨されている. われわれのamplicor法での検討では, ISDRに2個以上変異があると, 12週までのウイルス陰性化(early viral response : EVR)は79%であり, 最終的に82%がウイルス排除されていたが, ISDR変異数0ないし1個の症例では, EVRは60%にすぎなかった. しかし, EVR達

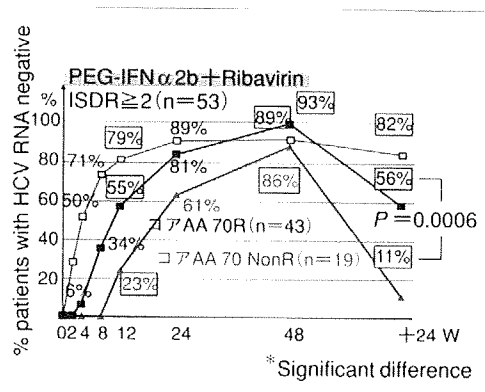


図3 ISDRとコアアミノ酸変異からみたウイルス累積陰性化率

成者のうち約80%がSVRとなることから, ISDR変異は, 少なくとも投与開始12週までの早期ウイルス動態を規定していて, EVRが達成さえすれば最終的なウイルス排除に結びつくものと考えられた. さらに, ISDR変異数0ないし1個の症例では, ウイルス動態は, コア70番アミノ酸により異なることも明らかになってきた. すなわち, コア70番アミノ酸がRであれば55%がEVRを達成し, このうち88%がSVRになるのに対し, R以外の変異例ではEVRを達成したのは23%にすぎず, このうち67%がSVRとなったにすぎなかった(図3). そこで, amplicor法で12週以降24週以内にHCV RNAが陰性化した(late viral response : LVR)症例については, 72週までの治療延長が考慮されるが, ISDR変異数0ないし1個の症例では約20%がこれに相当する. Bergらは, 治療開始12週までにウイルス陰性化が得られないものの24週までにウイルス消失した症例では, 治療期間を48週から72週に延長することで, SVR率が17%から29%に改善したと報告している<sup>11</sup>. Sanchez-Tapiasらは4週までにウイルス陰性化しなかった症例を72週まで治療延長した場合にSVR率が28%から44%に改善したことを報告している<sup>12</sup>. われわれの検討では, この症例群のSVRは40%であったが, まだ, 症例数が必ずしも多くないことや, ウイルス量の判定法が, 現在は, より鋭敏なreal time PCR法が主流となったことなどから, 今後の詳細な解析が待たれるところであるが, 現在までの検討ではEVR例に加え,

表3 1b型かつ高ウイルス例のC型肝炎ウイルス変異に基づく治療戦略

コアAA70	ISDR変異数	0・1	2~3	≥4
R		・ PEG + Riba (12か月) (LVR例では72週投与)	PEG + Riba (12か月)	IFN単独投与 (6~12か月)
NonR (Q)		・ PEG + Riba LVR例では72週投与 ・ 発癌予防のインターフェロン少量長期 ないしは肝庇護療法 ・ 将来のprotease阻害剤併用		

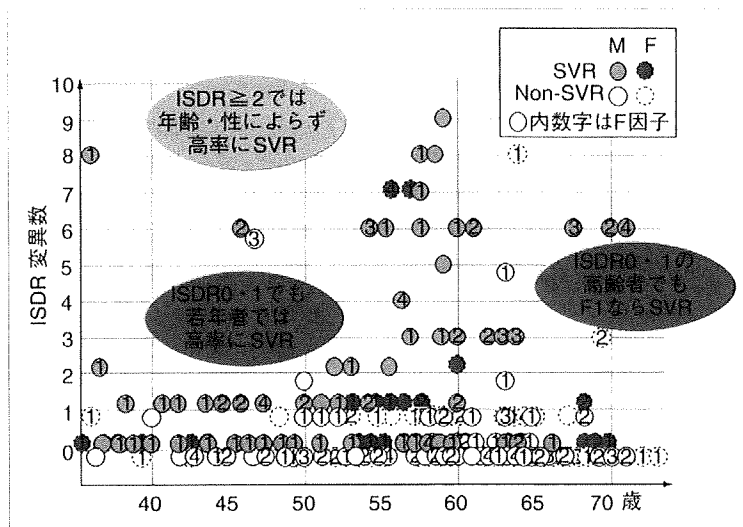


図4 ISDR・年齢・性別・肝線維化とSVRの関係

LVR例に治療期間を延長することで、コア70番アミノ酸がRであれば約70%、R以外では40%のSVR率が期待できることとなる。

したがって、現時点では、治療効果予測にはウイルス学的要因が考慮して治療方針を決定する。すなわち、1bかつ高ウイルス量症例では、まずISDRを測定し、4個以上変異があればインターフェロン単独療法(6か月)で十分であるし、2から3個変異があればペグインターフェロン+リバビリン48週間併用療法が選択される。しかしISDR変異数0ないし1個の症例では、コア70番アミノ酸がRの場合はペグインターフェロン+リバビリン併用48週間とし、コア70番アミノ酸がR以外で、HCV RNAが12週以降36週以内に陰性化した場合は、ペグインターフェロン+リバビリン72週間治療を考慮する。しかし、これ以外の場合は、肝機能を維持し、肝発癌抑制

を図るためのインターフェロン少量長期療法ないしは肝庇護療法を継続しつつ、現在臨床試験が進行中のNS3-4 protease阻害剤であるtelaprevirを含めた今後の治療を期待することとなる(表3)。

### 個別化治療の可能性

C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果は、遺伝子型、ISDR、コアアミノ酸変異の、ウイルス遺伝子変異により、ある程度予測可能となった。しかし、ISDRとコアアミノ酸変異などウイルス側要因が同一であっても、宿主因子である性別、年齢、肝線維化・脂肪化、初回・再治療、前治療の効果なども考慮しなければ、一律に治療方針を決定することはできない。われわれの検討でも、ウイルス側因子から難治であると想定されても、SVRとなった症例では、若年・男性・肝線維化が軽度である症例が多く含

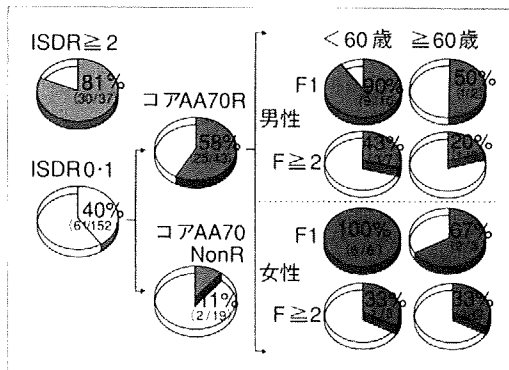


図5 遺伝子変異と宿主因子からみた1bかつ高ウイルス量症例に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法48週の治療成績

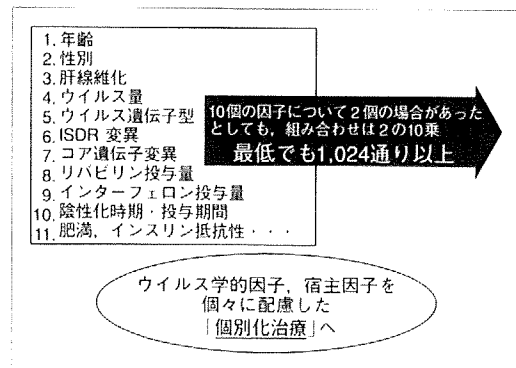


図6 遺伝子変異からみた1b型の慢性肝炎に対する個別化医療

まれ、ウイルス側因子からSVRが期待されながら治療に失敗した例では、高齢、線維化進展例などが多い(図4)。現在までに得られたISDRとコアアミノ酸変異からみた治療成績を示す(図5)<sup>13</sup>が、このほかにも、治療効果と関連すると考えられる因子は存在し、仮に10個の因子が関連するとして各因子に2個のカテゴリーが存在すると仮定しても $2^{10}=1024$ の組み合わせが存在することになる(図6)<sup>14</sup>。このうち治療効果予測にもっとも重要なものは、遺伝子型やISDRを含めたウイルス側因子であることは言うまでもないが、今後はこれら因子を組み合わせた詳細な治療効果予測によって、近い将来の、いわゆる個別化医療が可能になるものと思われる。また最近では、治療効果を予測する方法として、仮説を検証する従来の統計解析手法とはまったく異なる「データマイニング手法」を用いて治療効果を予測する因子を網羅的に解析しても、ウイルス側要因は非常に重要な因子であることが徐々に明らかになっている。

文 献

1) 平成20年度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)。B型及びC型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究。総括分担報告書。2008。  
 2) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C

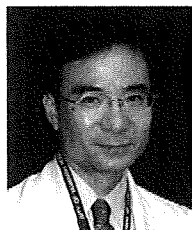
virus 1b infection. N Engl J Med 1996 ; 334 : 77-81.  
 3) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. J Clin Invest 1995 ; 96 : 224-30.  
 4) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al. Predictive factors of virological non-response to onterferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. J Med Virol 2006 ; 78 : 83-90.  
 5) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al. Predictors of viral kinetics to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. J Med Virol 2007 ; 79 : 1686-95.  
 6) Akuta N, Susuki F, Kawamura Y, et al. Prediction of response to pegylated intrerferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphisms in the viral core proteun and very early dynamics of viremia. Intervirology2007 ; 50 : 361-8.  
 7) Donlin MJ, Cannon NA, Yao E, et al. Pretreatment Sequence Diversity Differences in the Full-Length Hepatitis C Virus Open Reading Frame Correlate with Early Response to Therapy. J. Virol. 2007 ; 81 : 8211-24.  
 8) El-Shamy A, Nagano-Fijii M, Sasase N, et al. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. Hepatology

- 2008 ; 48 : 38-47.
- 9) 坂本 穰, 榎本信幸. ウイルス性慢性肝炎 : 診断と治療の進歩, 日本内科学会誌 2008 ; 97 : 57-63.
- 10) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. Hepatitis virus genome wide analysis. 肝疾患Review 2008-2009(小俣政男・監), 東京 : 日本メデイカルセンター ; 2008. p. 92.
- 11) Berg T, von Wagner M, Nasser D, et al. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1 : comparing 48 versus 72 weeks of peginterferonalpha-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 1086-97.
- 12) Sanchez-Tapias JM, Diago M, Escartin P, et al. Peginterferon-alfa-2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. *Gastroenterology* 2006 ; 131 ; 451-60.
- 13) 坂本 穰, 榎本信幸. 遺伝子変異からみたC型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果予測. 日本消化器病学会雑誌 2009 ; 106 : 485-92.
- 14) 坂本 穰, 榎本信幸. 治療効果予測とテーラーメイド治療の可能性. 消化器の臨床 2009 ; 12 : 68-73 .

\* \* \*

## C型肝炎ウイルス変異に基づく治療戦略

Treatment strategy of chronic hepatitis C using mutations in the HCV genome



坂本 稔(写真) 榎本信幸

Minoru SAKAMOTO<sup>1</sup> and Nobuyuki ENOMOTO<sup>2</sup>

山梨大学大学院医学工学総合研究部肝疾患地域先端医療システム学講座<sup>1</sup>, 同医学部内科学講座第1教室<sup>2</sup>

◎C型肝炎に対するインターフェロン治療は、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の登場により格段に進歩した。しかし、難治とされる1b型かつ高ウイルス量症例のSVR率は50%に満たない。この治療効果を規定する因子として重要なものは遺伝子型をはじめとしたウイルス側要因であり、とくにインターフェロン感受性領域(ISDR)やコア70番のアミノ酸変異が重要である。現時点ではISDRのアミノ酸変異数が2個以上であればペグインターフェロン+リバビリン併用療法48週間で治癒可能であり、0または1個変異ではコア70番アミノ酸がRの場合に治癒可能であり、R以外の変異型の場合はreal time PCR法で36週までにウイルス陰性化した場合のみが72週間の併用療法延長でウイルス排除が可能となる。したがって、これ以外の場合は肝癌抑制のためのインターフェロン少量長期または肝底療法により、将来使用可能となるtelaprevirを含むプロテアーゼ阻害剤を待つべきである。

**Key word** : C型肝炎, インターフェロン治療, インターフェロン感受性領域(ISDR), コア70番アミノ酸変異, テーラーメイド治療

C型肝炎に対する治療は、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の登場によって格段に進歩した。しかし、難治とされる遺伝子型(genotype)1かつ高ウイルス量症例では、併用療法を48週行っても約半数でのみウイルス排除(sustained viral response: SVR)が可能であるにすぎない。このインターフェロン反応性の違いについては、遺伝子型、ウイルス量、遺伝子変異などのウイルス側因子、性、年齢、肝線維化・脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子、また、薬剤の中止・減量、治療期間などの治療因子が関与していることが報告されている。このうち、遺伝子型とウイルス量をはじめとしたウイルス側の因子がもっとも重要であることは明らかで、遺伝子型2aや2b型は治療感受性がよいが、わが国で70%を占める1b型は治療抵抗性であり、とくにreal time PCR法で5 log IU/ml以上の高ウイルス量例はもっとも難治である。このため、厚生労働省の研究班から示されているガイドライン<sup>1)</sup>でも、現在もっとも強力なペグインターフェロン+リバビリン

併用療法は、初回治療の場合は高ウイルス量症例のみに限定され、1b型では48週間、2a/2b型では24週間の治療期間が標準とされている。このことは、低ウイルス症例ではリバビリンの併用を行わなくとも、インターフェロン単独療法で十分に治癒可能であることを示している。一方、1b型かつ高ウイルス量症例では、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法を48週間行ってもウイルス排除率は40%程度にとどまることから、治療開始前に効果を予測することは治療方針の決定や無用な治療を避けるために重要と考えられる。

### インターフェロンの治療効果に関連した遺伝子変異

C型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus: HCV)は+1本鎖のRNAウイルスであり、ゲノムの両端に非翻訳領域が存在し、中央部には約3,010個のアミノ酸からなる1本のポリ蛋白前駆体をコードするopen reading frameが存在する。この領域には、HCVの構造蛋白(コア、エンベロープ蛋白)とウイ

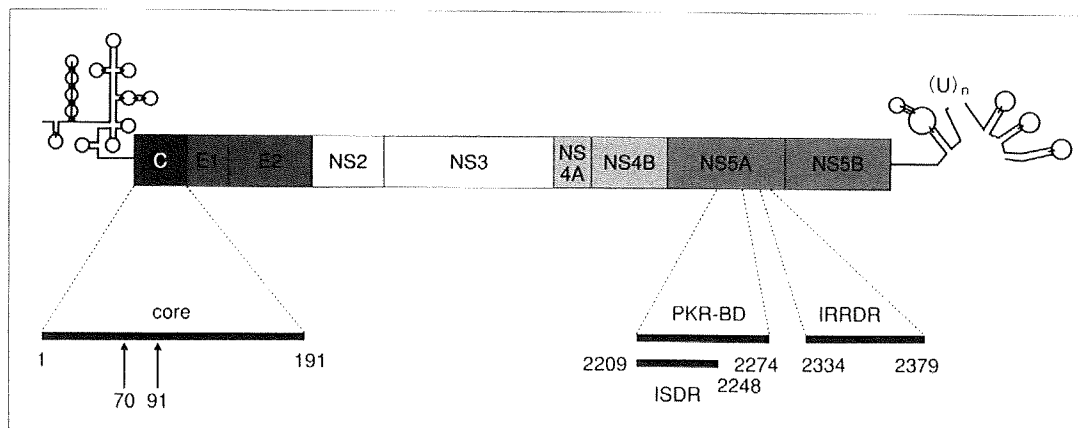


図 1 インターフェロン感受性に関連するC型肝炎ウイルスの遺伝子変異

ルス増殖に必要な種々の酵素をコードする非構造領域(nonstructural region: NS)が存在する。これまでインターフェロン治療の治療効果規定因子として明らかになっているウイルス側の因子は上述の遺伝子型、ウイルス量であるが、1b型ではこのほかに、インターフェロン感受性領域(interferon sensitivity determining region: ISDR)<sup>2,3)</sup>、コアアミノ酸変異<sup>4-7)</sup>、IFN/RBV 抵抗性領域(IFN/RBV resistance-determining region: IRRDR)<sup>8)</sup>などが報告されている(図 1)。

### ISDR

ISDR は、HCV の NS5A 領域 C 末端よりの 40 アミノ酸(a. a. 2209~2248)領域であり、インターフェロン単独療法の時代に 1b 型の著効症例と無効症例の全塩基配列の比較から見出されたものである。すなわち、インターフェロン単独 6 カ月間の治療で、この領域に、標準配列である HCV-J との比較で 4 個以上のアミノ酸変異がある(mutant type)と SVR になる可能性が高く、1~3 個の変異(intermediate type)や変異なし(wild type)では治療効果に乏しい。しかし、インターフェロン単独療法では治療効果はウイルス量と相関し、HCV RNA が多いほど治療効果が劣るため、ISDR 変異は単にウイルス量を反映しているにすぎないとの指摘もある。実際、ISDR は PKR binding domain の N 末端側に位置し、ウイルス増殖と密接に関連し、ISDR に変異が多くなるほどウイルス量は少なくなることが知られている。しかし、治

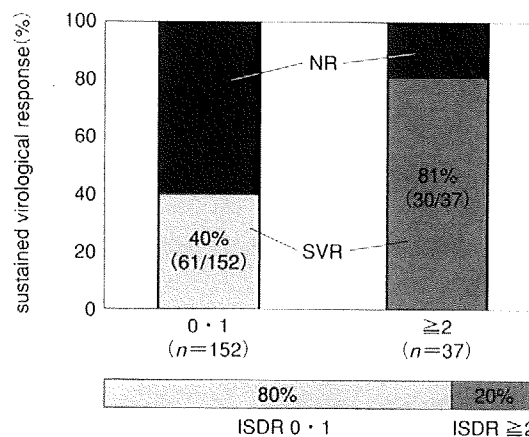


図 2 1b型かつ高ウイルス量症例の48週間のペグインターフェロン+リバビリン併用療法における ISDR変異数とSVR達成率(Y-PERS集積症例) (n=194)

療効果を規定する因子について多変量解析を行うと、ISDR はウイルス量とは関係なく SVR に寄与する独立した因子として認められる。一方、現在 1b 型かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する標準治療であるペグインターフェロン+リバビリン併用療法においても ISDR 変異は SVR を規定する独立した因子であることが、山梨大学第一内科と関連施設で組織する Y-PERS(Yamanashi PEG-interferon + Ribavirin Study)で集積された症例の検討で明らかになってきた。しかも、インターフェロン単独療法で SVR を得るためには 4 個以上のアミノ酸変異が必要であったが、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法においては 2 個以上の変異があれば、80%以上の高い確率で



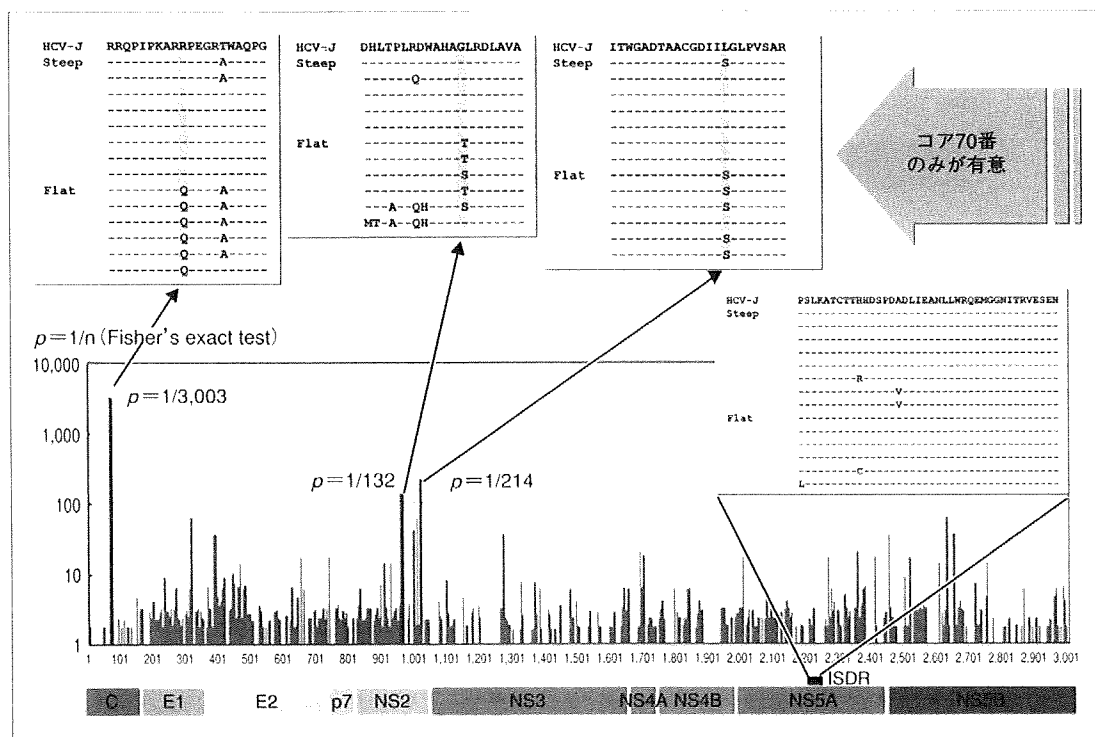


図 3 1b型のHCVのうちISDR変異数0ないし1個の症例での、ウイルス反応別の各アミノ酸部位の相違

SVRを期待できることが示されている(図2)<sup>9)</sup>。

### コアアミノ酸変異

1b型HCVのコア領域の70番と91番のアミノ酸変異がペグインターフェロン+リバビリン併用療法の治療効果を規定することは、Akutaらによって報告されている。すなわち野生型では、コアアミノ酸70番のアミノ酸はアルギニン(Arginine: R)で、91番はロイシン(Leucine: L)であるが、治療抵抗(non-virological response: NVR)例では、コア70番アミノ酸はグルタミン(Glutamine: Q)またはヒスチジン(Histidine: H)に、コア91番アミノ酸はメチオニン(Methionine: M)に置換されていることが多い。とくに、この両者が変異している non-double wild type はNVRにかかわる因子であり、両者が野生型(double wild type)であることがSVRに寄与する因子であると報告されている。したがって、コアアミノ酸70番あるいは91番のアミノ酸変異はそれぞれ独立して、あるいは相関して治療効果と関連することが示されている。

一方、著者らはISDR変異数が0または1個の症例のうち、4週間のペグインターフェロン+リバビリン併用投与で、HCVウイルス量が1log未満の低下しか得られなかった平坦反応(flat response)群と2log以上減少する急峻反応(steepest response)群の全塩基配列の比較から、コア70番のアミノ酸が治療効果に関連することを見出した。すなわち、両者のHCV蛋白すべてのアミノ酸残基を比較した結果、統計学的に有意差をもって相違がみられたのはコア70番目のアミノ酸のみであり、コア91番のアミノ酸を含む他の変異は関連があるものの有意な因子ではなかった(図3)<sup>10)</sup>。しかも、ISDR変異にかかわらず、治療効果に関与する因子について多変量解析すると、もっとも有意な因子は“ISDR変異数2個以上”であり(表1)、ISDR変異数0または1個の場合に限りコア70番のアミノ酸変異が治療効果を規定することが明らかになった。

表 1 1b型のHCVのうちペグインターフェロン+リバビリン併用療法48週間の治療に関する因子 (多変量解析)

		odds 比	95%CI	p
年齢	<60/≥60	0.255	0.057~0.886	0.0329
F 因子	0~1/2~4	0.139	0.034~0.563	0.0061
ISDR 変異数	0~1/2~	164.571	8.458~>999.9	0.0008
コア AA70	Q/R	13.840	2.464~77.739	0.0028

n=194, 多変量ロジスティック回帰分析.

## ISDRとコアアミノ酸変異を組み合わせた効果予測と治療戦略

1b 型の C 型慢性肝炎では, ISDR とコアアミノ酸変異の組合せで詳細な治療効果予測が可能となった. すなわち, まず ISDR を測定し, 4 個以上のアミノ酸変異があればインターフェロン単独療法 6 カ月でも約 70% の SVR 率が期待できる. また, 2 個以上, すなわち 2 または 3 個のアミノ酸変異があれば, 48 週間のペグインターフェロン+リバビリン併用療法で 80% の SVR が期待できる. ISDR 変異数が 0 または 1 個の場合は, コア 70 番のアミノ酸が R である場合でのみ 60% の SVR が期待できるが, R 以外の場合の SVR 率は約 10% で, 治療はほとんど望めない. したがって, これらの症例の場合は, 治療効果を高めるために何らかの治療の工夫が必要となってくる. 今後, 新しい治療法が出現する可能性もあるが, 現在ただちに可能なことはペグインターフェロン+リバビリン併用療法の治療期間の延長である. 先のガイドラインでも「投与開始 12 週後に HCV RNA 量が前値の 1/100 以下に低下するが HCV RNA が Real time PCR 法で陽性で, 36 週までに陰性化した例」では, プラス 24 週(トータル 72 週間)の治療が推奨されている. 著者らの Amplicor 法での検討では, ISDR に 2 個以上変異があると 12 週までのウイルス陰性化(early viral response: EVR)は 86% であり, 最終的に 81% がウイルス排除されていたが, ISDR 変異数 0 または 1 個の症例では EVR は 60% にすぎなかった. しかし, EVR 達成者のうち約 80% が SVR となることから, ISDR 変異はすくなくとも投与開始 12 週までの早期ウイルス動態を規定していて, EVR を達成さえすれば最終的なウイルス排除に結びつくものと考えられた. さらに, ISDR 変異数 0 または 1 個の症例で

は, ウイルス動態はコア 70 番アミノ酸により異なることも明らかになってきた. すなわち, コア 70 番アミノ酸が R であれば 65% が EVR を達成し, このうち 88% が SVR になるのに対し, R 以外の変異例では EVR を達成したのは 18% にすぎず, このうち 67% が SVR となったにすぎなかった. そこで, Amplicor 法で 12 週以降 24 週以内に HCV RNA が陰性化した(late viral response: LVR)症例については 72 週までの治療延長が考慮されるが, ISDR 変異数 0 または 1 個の症例では約 20% がこれに相当する. Berg らは治療開始 12 週までにウイルス陰性化が得られないものの 24 週までにウイルス消失した症例では, 治療期間を 48 週から 72 週に延長することで SVR 率が 17% から 29% に改善したと報告している<sup>11)</sup>し, Sanchez-Tapias らは 4 週までにウイルス陰性化しかなかった症例を 72 週まで治療延長した場合に SVR 率が 28% から 44% に改善したことを報告している<sup>12)</sup>. 著者らの検討では, この症例群の SVR は 40% であったが, まだ症例数がかならずしも多くないことや, ウイルス量の判定法が現在はより鋭敏な Real time PCR 法が主流となったことなどから今後の詳細な解析が待たれるところであるが, 現在までの検討では EVR 例に加え, LVR で治療期間を延長することで, コア 70 番アミノ酸が R であれば約 70%, R 以外では 40% の SVR 率が期待できることとなる.

したがって現時点では, 治療効果予測にはウイルス学的要因がもっとも有用であることから, これらを考慮して治療方針を決定する. すなわち, 1b かつ高ウイルス量症例ではまず ISDR を測定し, 4 個以上変異があればインターフェロン単独療法(6 カ月)で十分であるし, 2 または 3 個変異があればペグインターフェロン+リバビリン 48

表 2 1b型かつ高ウイルス例のC型肝炎変異に基づく治療戦略

ISDR 変異数 コア AA70	0・1	2・3	≥4
R	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ PEG+Riba (12 カ月)</li> <li>(LVR 例では 72 週投与)</li> </ul>	PEG+Riba (12 カ月)	IFN 単独投与 (6~12 カ月)
NonR(Q)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ PEG+Riba (LVR 例では 72 週投与)</li> <li>・ 発癌予防の IFN 少量長期ないしは肝庇護療法</li> <li>・ 将来の protease 阻害剤併用</li> </ul>		

PEG：ペグインターフェロン、IFN：インターフェロン、Riba：リバビリン。

週間併用療法が選択される。しかし、ISDR 変異数 0 または 1 個の症例では、コア 70 番アミノ酸が R の場合はペグインターフェロン+リバビリン併用 48 週間とし、コア 70 番アミノ酸が R 以外で、HCV RNA が 12 週以降 36 週以内に陰性化した場合はペグインターフェロン+リバビリン 72 週間治療を考慮する。しかし、これ以外の場合は肝機能を維持し、肝発癌抑止をはかるためのインターフェロン少量長期療法または肝庇護療法を継続しつつ、現在臨床試験が進行中の telaprevir を含めたプロテアーゼ阻害剤を含めた今後の治療を期待することとなる(表 2)。

### テラーメード治療の可能性

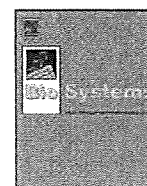
C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果は、遺伝子型、ISDR、コアアミノ酸変異の、ウイルス遺伝子変異により、ある程度予測可能となった。しかし、ウイルス側要因が同一であっても性、年齢、肝線維化・脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子や薬剤の中止・減量、治療期間などの治療因子により治療効果が異なる。著者らの検討でも、ウイルス側要因から難治と考えられた症例でもウイルス排除がなされた症例では若年・男性・肝線維化が軽度である症例が多く含ま

れ、ウイルス側因子により SVR が期待されながらウイルス排除がなされなかった症例では高齢、線維化進展例などが多かった。今後はこれら因子を組み合わせ個々に判断することで、近い将来のいわゆる個別化医療が可能になるものと思われる。

### 文献

- 1) 平成 19 年度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)、B 型及び C 型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究、総括研究報告書、2007。
- 2) Enomoto, N. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **334** : 77-81, 1996.
- 3) Enomoto, N. et al. : *J. Clin. Invest.*, **96** : 224-230, 1995.
- 4) Akuta, N. et al. : *J. Med. Virol.*, **78** : 83-90, 2006.
- 5) Akuta, N. et al. : *J. Med. Virol.*, **79** : 1686-1695, 2007.
- 6) Akuta, N. et al. : *Intervirology*, **50** : 361-368, 2007.
- 7) Donlin, M. J. et al. : *J. Virol.*, **81** : 8211-8224, 2007.
- 8) El-Shamy, A. et al. : *Hepatology*, **48** : 38-47, 2008.
- 9) 坂本 稔, 榎本信幸 : 日本内科学会雑誌, **97**(1) : 57-63, 2008.
- 10) 前川伸哉・他 : Hepatitis virus genome wide analysis. 肝疾患 Review 2008-2009(小俣政男監). 日本メデイカルセンター, 2008, pp.92-97.
- 11) Berg, T. et al. : *Gastroenterology*, **130** : 1086-1097, 2006.
- 12) Sanchez-Tapias, J. M. et al. : *Gastroenterology*, **131** : 451-460, 2006.

\* \* \*



## Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model

Jun Itakura<sup>a,\*</sup>, Masayuki Kurosaki<sup>a</sup>, Yoshie Itakura<sup>a</sup>, Sinya Maekawa<sup>b</sup>, Yasuhiro Asahina<sup>a</sup>, Namiki Izumi<sup>a</sup>, Nobuyuki Enomoto<sup>b</sup>

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

<sup>b</sup> First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, 1110, Shimogatou, Chuou-shi, Yamanashi 409-3898, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 June 2009

Received in revised form 27 August 2009

Accepted 6 September 2009

#### Keywords:

Agent-based model

Virus infectious disease

### ABSTRACT

We created agent-based models that visually simulate conditions of chronic viral infections using two software. The results from two models were consistent, when they have same parameters during the actual simulation. The simulation results comprise a transient phase and an equilibrium phase, and unlike the mathematical model, virus count transit smoothly to the equilibrium phase without overshooting which correlates with actual biology in vivo of certain viruses. We investigated the effects caused by varying all the parameters included in concept; increasing virus lifespan, uninfected cell lifespan, uninfected cell regeneration rate, virus production count from infected cells, and infection rate had positive effects to the virus count during the equilibrium period, whereas increasing the latent period, the lifespan-shortening ratio for infected cells, and the cell cycle speed had negative effects. Virus count at the start did not influence the equilibrium conditions, but it influenced the infection development rate. The space size had no intrinsic effect on the equilibrium period, but virus count maximized when the virus moving speed was twice the space size. These agent-based simulation models reproducibly provide a visual representation of the disease, and enable a simulation that encompasses parameters those are difficult to account for in a mathematical model.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

All viruses need hosts as a basis for their life. When a virus enters the host body, it invades cells and uses both its own enzymes and those of the host cells to replicate. Host cells infected by viruses launch a self-defense system known as the innate immune system (See and Wark, 2008; Nanche, 2009), which inhibits viral replication and uses the human leukocyte antigen system and cytokines to elicit an immune response. Immune cells that have received signals from host cells activate other immune cells, neutralize viruses in the serum by means of antibodies, and prevent the virus from replicating and proliferating by destroying or curing host cells. Viral infection is a disorder based on the interactions between viruses and cells.

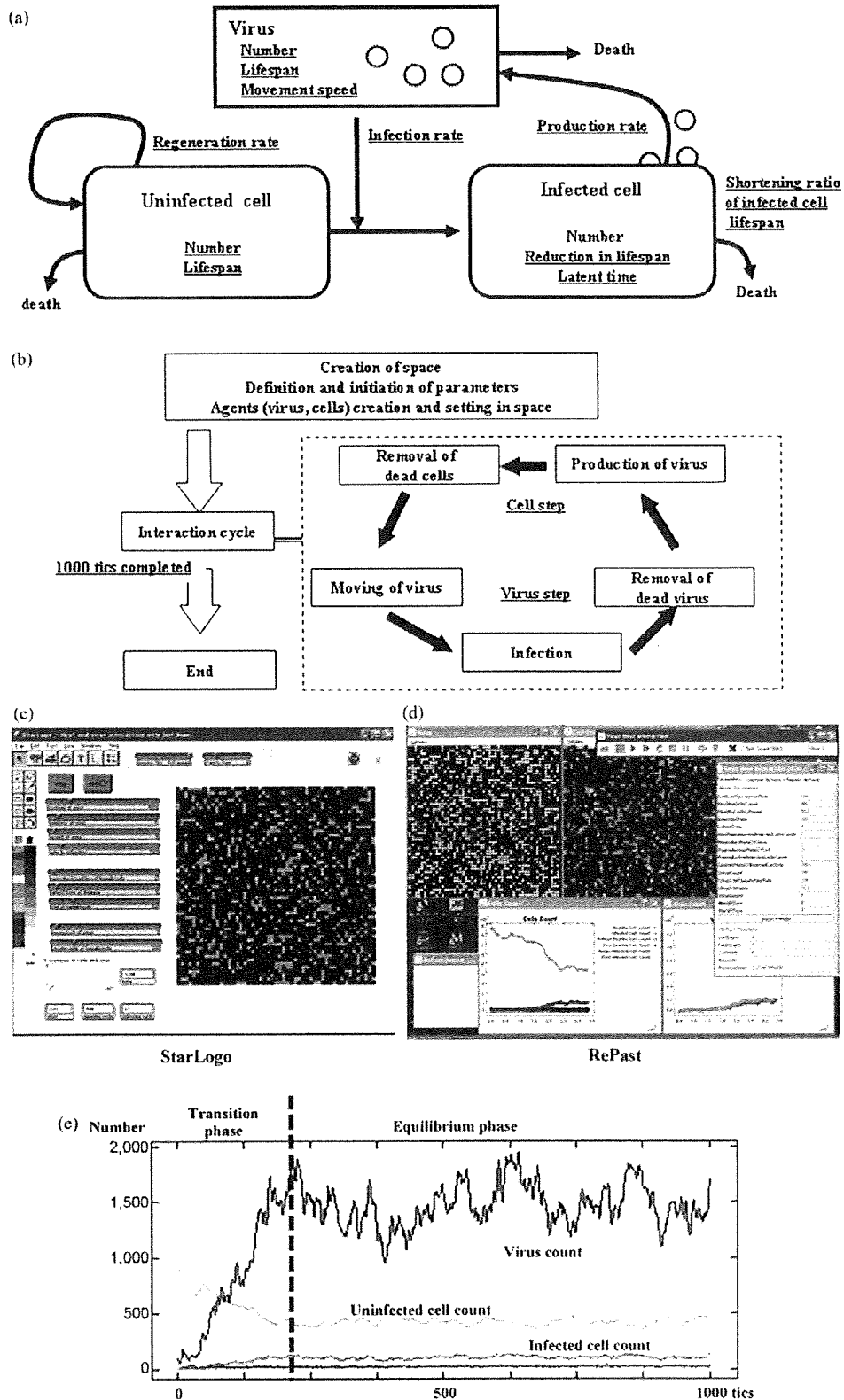
The power relationship between these agents changes along with the progression of the disease. In the very early stages of infection, as the host defense mechanisms are immature, the virus has the ability to overwhelm the host cells, actively replicate, and proliferate. Subsequently, as the capacity of the immune system improves, the speed of viral proliferation drops and the virus count reaches a peak. Infected host cells begin to be disrupted by the immune system or virus particles, and symptoms appear as a result. If the immune system is stronger than the virus, then the viral counts decline, and, in transient viral disorders, the virus is finally eliminated and the host recovers. In chronic viral disorders, however, the power relationship between the virus and host cells reaches equilibrium, and a long-term power balance is maintained with the virus count reaching a plateau.

Mathematical models have been proposed to study the dynamics of such viral disorders, and are regarded as being of value in understanding this phenomenon (Ho et al., 1995; Nowak et al., 1996; Neumann et al., 1998). However, these models are difficult to understand for clinicians, and their applicability is somewhat limited in everyday practice. In clinical research, measurements of viral dynamics in patients for short duration have been made for human

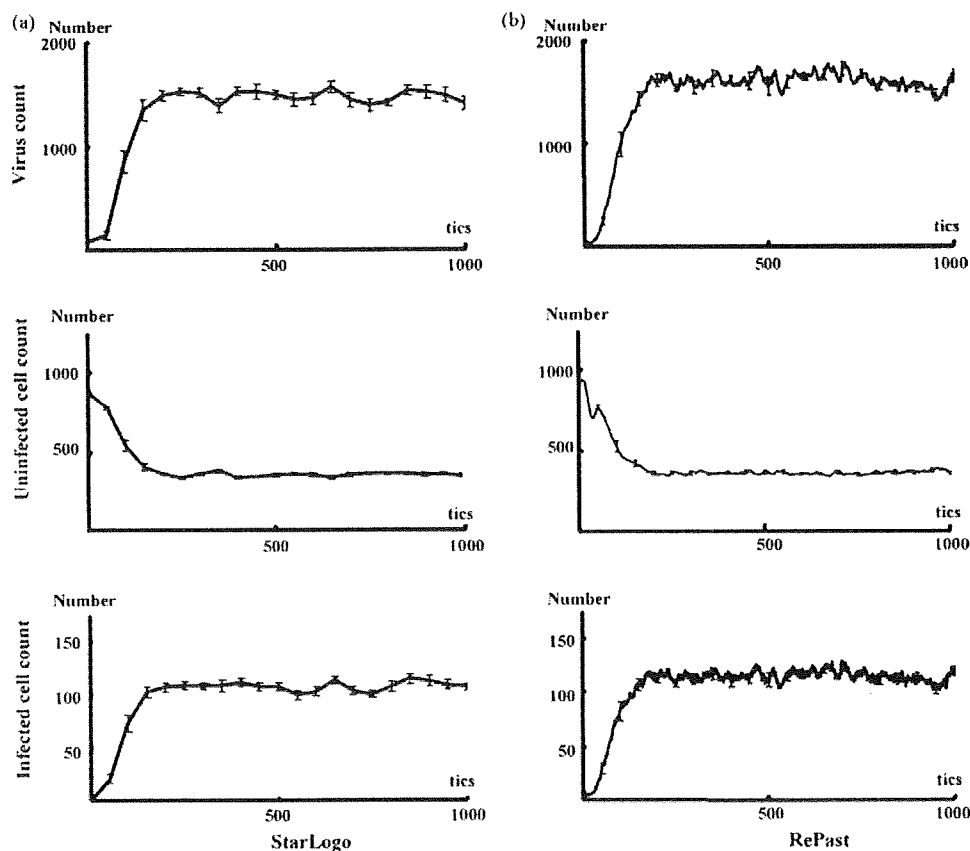
**Abbreviations:** HIV, human immunodeficiency virus; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus.

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

E-mail address: [jitakura@musashino.jrc.or.jp](mailto:jitakura@musashino.jrc.or.jp) (J. Itakura).



**Fig. 1.** Simulation design and an example of simulation results. (a) Model concept. Viruses, uninfected cells, and infected cells were treated as agents, and parameters were set for each of these and for interactions between agents (underlined). (b) Flowchart of the program. After preparing the simulation, we entered the interaction cycle, in which virus steps (such as movement) and cell steps were repeated. One cycle was counted as 1 tic, and the simulation concluded after 1000 tics. (c and d) Simulation screen using (c) StarLogo and (d) RePast. Yellow circles are viruses, green squares are uninfected cells, and orange and red indicate infected cells, with orange indicating the latent period. In StarLogo, all the agents are shown on the same screen, but in RePast, viruses and cells are shown in separate windows. (e) Example of a simulation chart in StarLogo. After the start of simulation the virus count and infected cell count increase while the uninfected cell count decreases, with equilibrium state reached after a certain number of tics.



**Fig. 2.** Comparison of simulation results in (a) StarLogo and (b) RePast. The results were consistent when the parameters were made consistent. (Virus count [average  $\pm$  SD]: StarLogo  $1458.03 \pm 173.1$ , RePast  $1462.71 \pm 178.8$ ,  $p=0.94$ . Uninfected cell count:  $364.24 \pm 30.4$ ,  $368.11 \pm 33.4$ ,  $p=0.83$ . Infected cell count:  $105.73 \pm 13.0$ ,  $107.74 \pm 13.0$ ,  $p=0.24$ . Unpaired Student's  $t$ -test.) Parameter values were set as follows: initial virus count, 100; uninfected cell count, 880; infected cell count, 0; virus speed of movement, 5 grids/tic; infection rate, 10%; uninfected cell regeneration rate, 1%; latent period, 3 tics; and virus reproduction rate, 5/cells/tic. The following parameter settings were taken from actual measurements: virus lifespan, 4.5 tics; uninfected cell lifespan, 49.8 tics; and infected cell lifespan, 6.7 tics.

immunodeficiency virus (HIV) (Ho et al., 1995), hepatitis B virus (HBV) (Nowak et al., 1996) and hepatitis C virus (HCV) (Neumann et al., 1998), and research is also underway on a range of models based on animal experiments and cell culture systems. As chronic viral disorders persist over long periods of time complete follow-up of viral dynamics is difficult. Furthermore, limitations of items that can be measured, such as the difficulty of measuring whole numbers of host cells, make it extremely difficult to investigate their consistency in mathematical models.

The recent ascend of dynamic-models owes much to advances in computers. Computer performance has improved markedly in recent years, not only in terms of their calculating capacity but also with regard to image displays, and models that offer a visual representation of viral disorders are now being reported (Gilbert and Bankes, 2002; Duca et al., 2007; Shapiro et al., 2008; Castiglione et al., 2007). One advantage of such visual models is that by providing a visual representation, they make understanding the disease status easy. Another benefit is that they enable parameters to be identified that are hidden as background noise in mathematical models. However, these models have some problems; it is difficult to prove the reproducibility of the simulation results derived from different languages or libraries, difficult to prove the validity of the model's concepts, and difficult to prove that the simulation results accurately reflect the reality. In this study, we created agent-based computer models that visually simulate the conditions of chronic viral infections using two software. The reproducibility of two agent-based computer models and the differences between agent-based models and the mathematical model were analyzed.

This agent-based model enabled us to investigate how each parameter included in the concept affects the conditions of chronic viral infections.

## 2. Methods

### 2.1. Selection of Software

In this study, we used two different types of softwares: StarLogo version 2.0 (<http://education.mit.edu/starlogo/>) supplied by MIT Media Laboratory and Recursive Porous Agent Simulation Toolkit (RePast-3.0, <http://repast.sourceforge.net/>) supplied by the Argonne National Laboratory. StarLogo uses Logo, one of the simplest programming languages, and has a fixed graphical user interface. RePast is a library that uses Java, another programming language, which also has a fixed graphical user interface.

Logo is an assembly language, and StarLogo carries out processing sequentially. Java is an object-oriented language, and RePast has a faster processing speed than StarLogo. In addition, StarLogo has a number of stipulations to simplify simulations, such as parameters can only be set up to five decimal places and the simulation space is also fixed as  $51 \times 51$  square grids. RePast, on the other hand, has fewer such restrictions. Thus, it offers a higher degree of freedom in program settings than StarLogo. Taking simulation space as an example, in spite of the restrictions imposed by the underlying operating system's image display system, any number of grids can be set and a hexagonal grid could also be chosen rather than a square one. However, users must stipulate and set all parameters themselves. This means that they must first declare the shape of the grid and the number of grids they will use to fill the simulation space. Java is also more difficult to learn than Logo, and debugging and correcting the program is also more difficult. Thus, it is difficult to judge whether or not the results agree with the planned simulation.

In effect, these two different types of softwares are polar opposites. It is simple to start a simulation in StarLogo, but producing results takes time and it is difficult to carry out more complex simulations. In RePast it is difficult to compose the program and judge whether or not the planned study has actually been achieved, but the

simulation itself takes only a short time to complete and there are lesser restrictions in the construction of a simulation model.

## 2.2. Concept for Modeling

We applied the basic virus–host interaction mathematical model to the agent-based simulation system with slight modifications. The mathematical model was used to describe the dynamics of HIV (Ho et al., 1995), HBV (Nowak et al., 1996), and HCV (Neumann et al., 1998) and the only agents involved were host cells and viruses, without the inclusion of immune cells. The effects of the immune system are expressed by varying parameters such as lifespan of host cells and viruses.

Fig. 1a illustrates the study concept. Viruses have the ability to infect healthy host cells (uninfected cells) and the infected cells produce new viruses. Both cells and viruses have definite lifespans, and the lifespan of infected cells is usually shorter than that of uninfected cells. Uninfected cells automatically regenerate within the space, whereas infected cells only arise due to infection of uninfected cells. Viruses also lack the ability to regenerate themselves and are only produced from infected cells.

## 2.3. Parameter Settings

In the present study, as the StarLogo settings are circumscribed, we limited the simulation space to  $51 \times 51$  square grids. However, we made an exception here while investigating the effects of size of space on the simulation results. The numbers of viruses, uninfected cells, and infected cells could only be set before the start of the simulation. As described in the later, our simulation ran in cycles, with 1 cycle defined as 1 tic.

In mathematical simulation models, the death rate is required as a parameter. However, in our program we set lifespans for viruses and uninfected cells. These lifespans were not uniform, but were set to have a deviation of about 10%. The lifespan of cells was shortened by infection with ratio decided beforehand.

The infection ratio was meaningful only when an infected cell and a virus coincidentally occupied the same grid, and this was used to calculate the probability of the infection occurring in that situation. The virus production rate was set as the number of viruses produced by an infected cell during 1 tic. Infected cells could be set as a parameter indicating the latent period between the time of virus infection and the time of virus replication.

In order to emulate the tissue repair capacity, we set uninfected cell regeneration rate such that grids without any cells had a specified probability of producing uninfected cells on top of themselves. As a result, the more the cell count declined within a space the more regenerated uninfected cells were produced, whereas the number of regenerated cells declined as cell count increased.

The number of grids through which a virus could move in 1 tic was set as the speed of movement, and the direction of movement was set within a range of  $90^\circ$  toward the top of the simulation space. The program used a circulatory method of movement; when a virus arrived at the top of the space, it was translocated to the bottom, and moved again toward the top. Cells were fixed on the grid.

## 2.4. Simulation Flowchart

Fig. 1b shows a flowchart of the program. First, the simulation space was produced, after which each parameter was defined and the initial settings were made. Next the agents – viruses and uninfected and infected cells – were produced. The simulation cycle was as follows. Viruses moved to a new grid, and if an uninfected cell was present, this was infected with a probability based on the infection rate. The lifespan of the virus decreased, and viruses that had completed their lifespan and those that had caused an infection were removed from the space. Infected cells produced new viruses, the lifespans of both uninfected and infected cells decreased. Then, cells that had completed their lifespan were eliminated and a new cycle began. The program was set such that the simulation ended after this cycle had repeated 1000 times. This meant that one simulation was complete after 1000 tics.

## 2.5. Data Collection

The RePast model was programmed such that data for each tic was saved automatically as a text file at the end of the simulation. This text file could be opened by a database software. The StarLogo model was programmed to stop the simulation and collect data after every 50 tics.

## 2.6. Mathematical Model

In order to compare the results of this agent-based simulation, we used a viral infection mathematical model, which we improved as follows.

$$\frac{dT}{dt} = s[2601 - (T + I)] - dT - bVT \quad (1)$$

$$\frac{dI}{dt} = bVT - dI \quad (2)$$

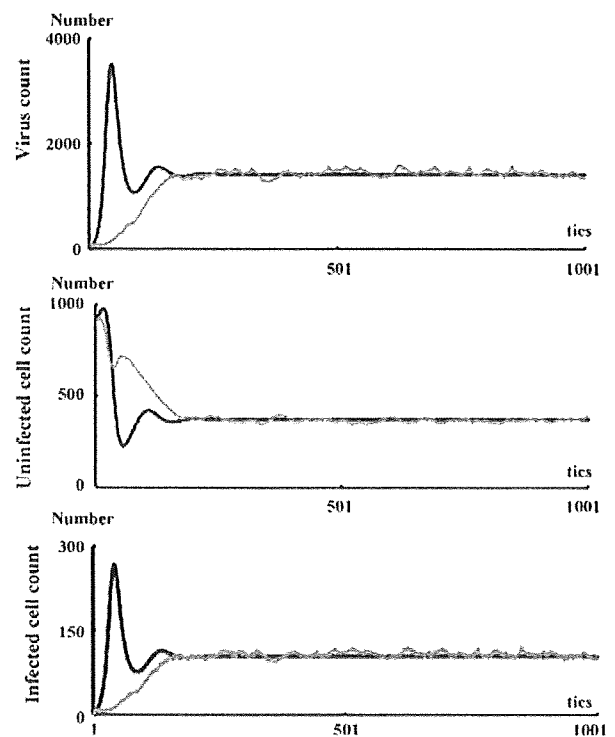


Fig. 3. Comparison of results of agent-based simulation and mathematical simulation. Both sets of results were consistent for the equilibrium phase, but differed in the shift in transition phase. Black line: mathematical model; grey line: results of simulation in RePast. Parameter values were set as follows: initial virus count, 100; uninfected cell count, 880; infected cell count, 0; virus speed of movement, 5 grids/tic; infection rate, 10%; uninfected cell regeneration rate, 1%; latent period, 3 tics; virus reproduction rate, 5/cells/tic; virus lifespan, 10 tics; uninfected cell lifespan, 50 tics; and cell lifespan-shortening ratio as a result of infection, 69%.

$$\frac{dV}{dt} = pI - cV \quad (3)$$

where,  $T$  is the uninfected cell count,  $I$  is the infected cell count, and  $V$  is the virus count. Uninfected cells are supplied to the space with a probability  $s[2601 - (T + I)]$ , as the number of grids in this agent-based simulation model was 2601 ( $51 \times 51$ ). The death rate of uninfected cells is  $d$ , the death rate of infected cells is  $\delta$ , and the death rate of viruses is  $c$ . The infection rate is indicated by  $\beta$ . Viruses are released from infected cells at a probability  $p$ .

## 2.7. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by statistical tests using the program StatView 5.0 (SAS Institute Inc.). All tests of significance were two-tailed, with  $p$  values of  $<0.05$  considered to be significant.

## 3. Results

### 3.1. Reproducibility of Chronic Viral Infection Disease Models Using Agent-based Simulation Methods

We constructed the chronic viral infection model with StarLogo library. Fig. 1c shows the simulation screen, and Fig. 1e shows one sample result. Immediately after the start of the simulation, the virus count temporarily dropped in accordance with the onset of an infection. Subsequently, the virus count started to increase with an increase in the infected cells and a decrease in the uninfected cells. After a certain number of tics (around 300 in this example), although the virus count, infected cell count, and uninfected cell count had some fluctuation, an equilibrium state was reached. We use the following descriptive terms in this paper: the transient phase is the period during which virus growth peaks, and the equilibrium phase is the period during which an equilibrium state is

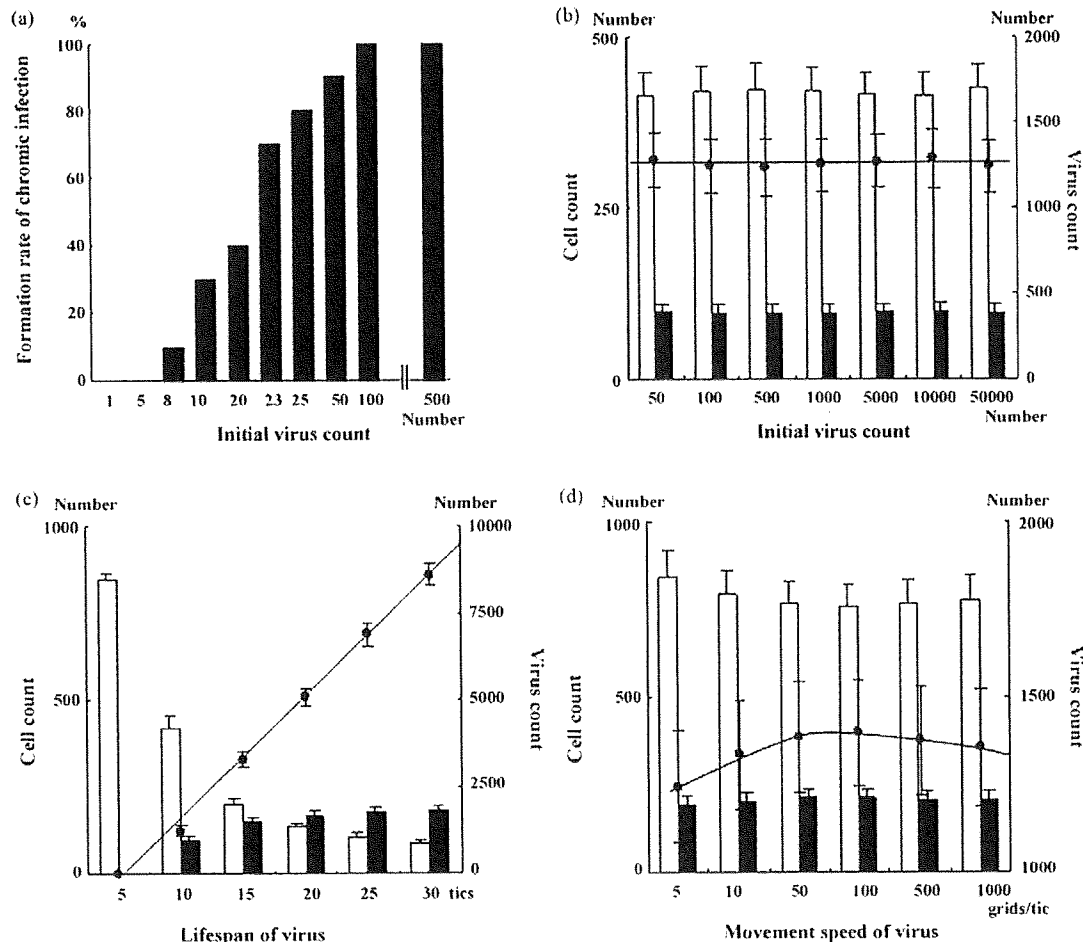


Fig. 4. Effects of changes in viral parameters. (a) The higher the initial virus count, the greater is the increase in the rate of formation of chronic infection, but (b) there was no effect on the conditions in the equilibrium phase. (c) Extending the virus lifespan increased the virus count. (d) Increasing the speed of virus movement to 100 grids/tic increased the virus count, but increasing it to 500 grids/tic had the opposite effect, with a slight declining trend. (a) Black bars: number of infections produced; (b–d) black circles: virus count; line: virus count approximation curve; white bars: uninfected cell count; black bars: infected cell count.

established. When the simulation was performed multiple times, the features described above were maintained, and the average values for virus, infected cell, and uninfected cell counts during the equilibrium state were all consistent.

Fig. 1d shows the simulation screen of the RePast. When we attempted setting all the initial parameters to the same values as those in the StarLogo, the results were not consistent. When we recalculated the parameters from the simulation results, in RePast, the parameters were largely maintained at the levels of the settings, but in StarLogo, the lifespans of both cell types became shorter than the settings while the simulation was in progress. We made the results of both simulations consistent by using the same parameters during the actual simulation (Fig. 2a and b).

### 3.2. Comparison Between Agent-based Simulation Models and Mathematical Simulation Model

We investigated whether the results of a chronic viral infection disease model produced by RePast would be consistent with the results of a mathematical model. For the mathematical model, we carried out an approximate integration using a four-dimensional Runge–Kutta method to ensure that the uninfected cell count and infected cell count would be in the same class. Parameters were always fixed as constant between simulations. The simulation results were consistent for the equilibrium

phase, but transitions in virus count during the transient phase varied, with a shift to equilibrium state following two overshoots in the mathematical model, but a monotonic increase following a logistic curve in the agent-based model (Fig. 3). In the mathematical model, when the equilibrium condition was calculated with  $dT/dt = dI/dt = dV/dt = 0$ , the equilibrium-phase virus count, uninfected cell count, and infected cell count were very similar to those of the agent-based model (virus count: mathematical model 371.8/space, agent-based model  $371.1 \pm 32.4$ /space [average  $\pm$  SD]; uninfected cell count: mathematical model 1605/space, agent-based model  $1454 \pm 194$ /space; infected cell count: mathematical model 115.9/space, agent-based model  $108.3 \pm 14.2$ /space).

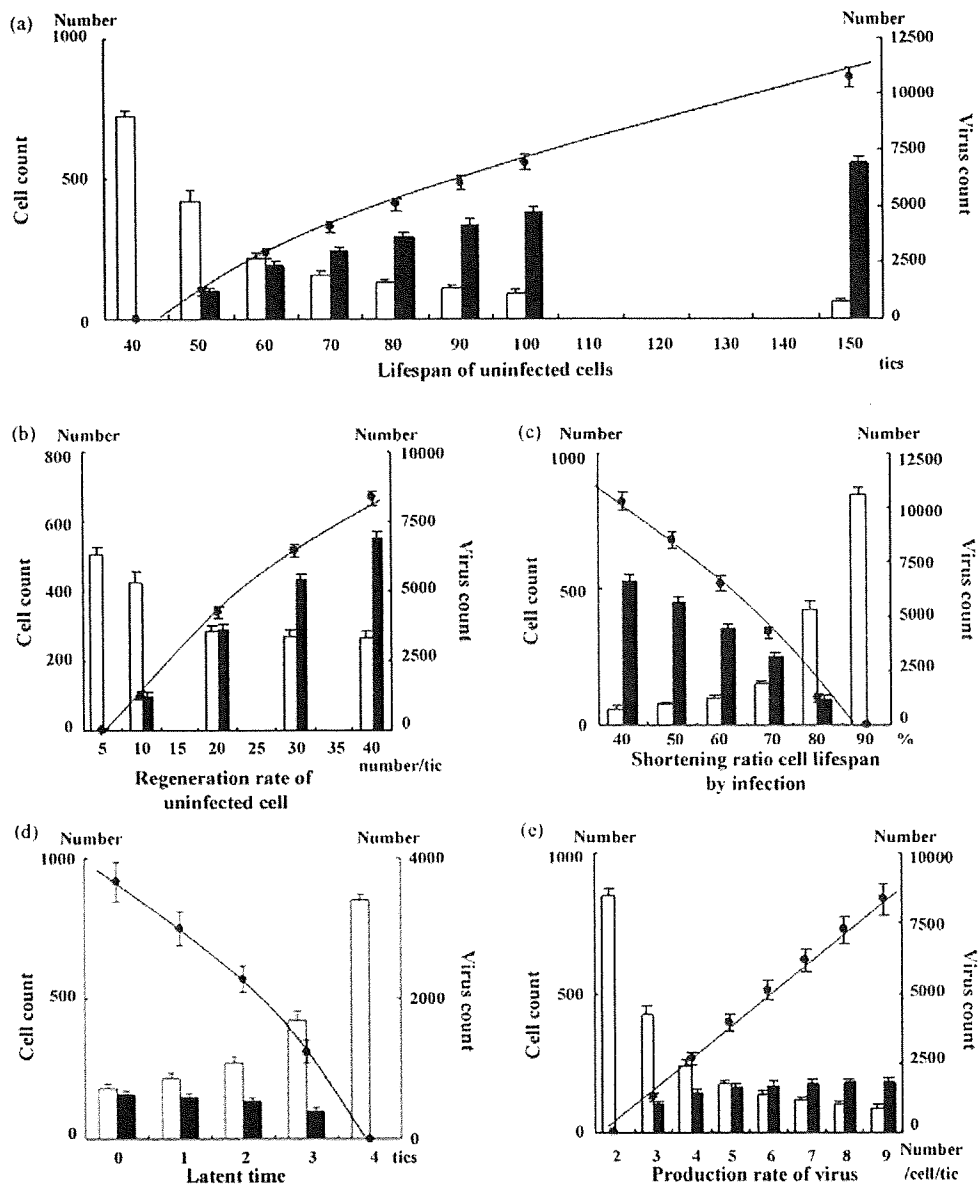
### 3.3. Usability of the Models; Effect of Changing Parameters

We investigated the changes in the equilibrium phase brought about by changing each parameter. All the investigations below were carried out by using RePast, and we used the average values from ten simulations.

### 3.4. Viral Parameters

The lower the virus counts at the beginning of the simulation, the lower the probability of a chronic infection (Fig. 4a). However, the initial virus count did not have any effect on the equilibrium





**Fig. 5.** Effects of changes in cell parameters. (a) Extending the uninfected cell lifespan and (b) increasing the uninfected cell regeneration rate increased the virus count. (c) Raising the lifespan-shortening ratio as a result of infection shortened the lifespan of infected cells, thereby decreasing the virus count. (d) Extending the latent period shortened the period of virus production from infected cells, thereby decreasing the virus count. (e) Increasing the virus production count resulted in a linear increase in equilibrium-phase virus count. Black circles: virus count; line: virus count approximation curve; white bars: uninfected cell count; black bars: infected cell count.

phase itself (Fig. 4b). Extending the lifespan of viruses resulted in a linear increase in equilibrium-phase virus count (Fig. 4c). Although the infected cell count increased, the rate of increase gradually declined. Changing the speed of viral movement resulted in the equilibrium-phase virus count to eventually decline after 100 grids/tic was reached, allowing movement over an area twice the size of the simulation space (Fig. 4d).

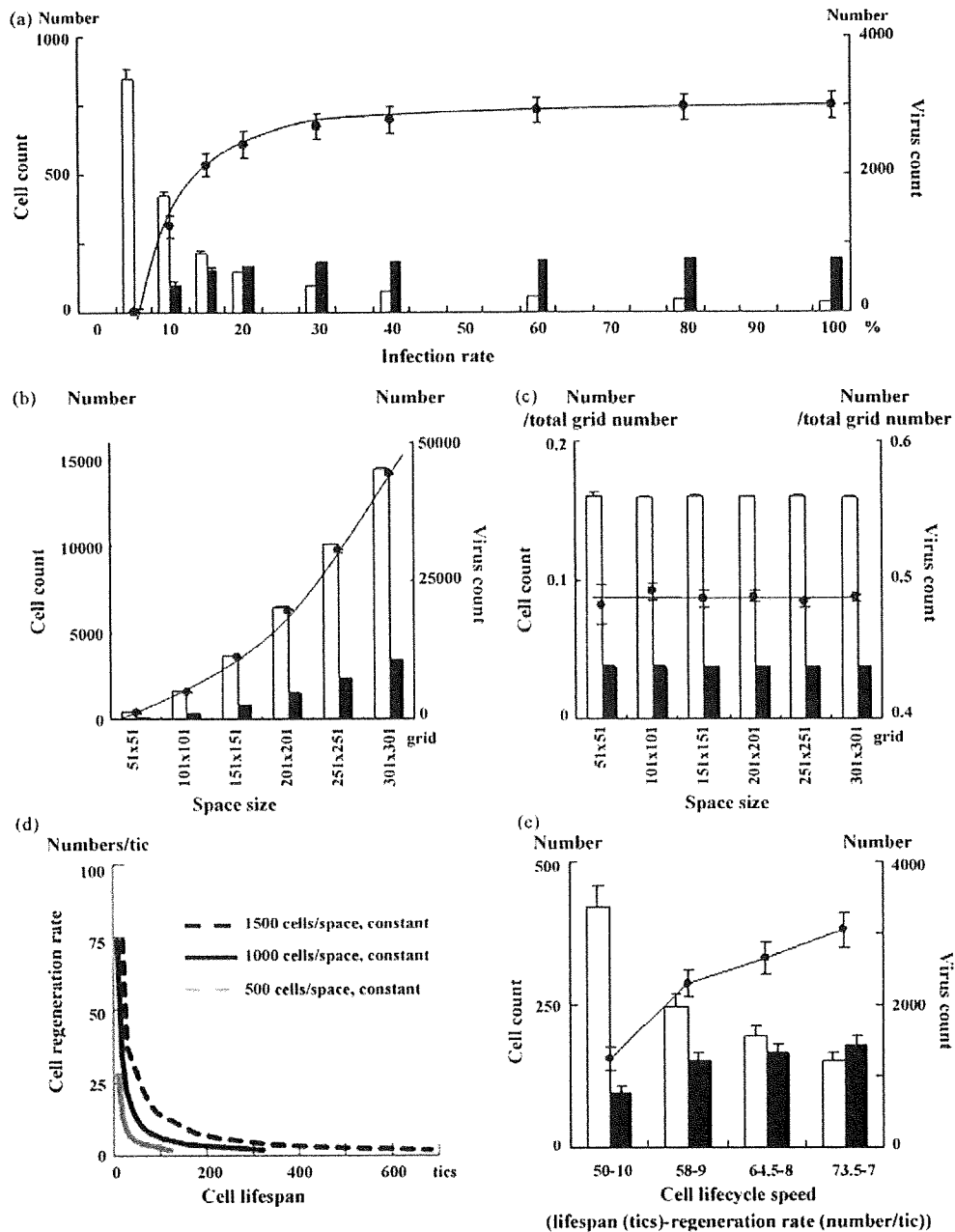
### 3.5. Uninfected Cell Parameters

Extending the lifespan of uninfected cells led to an increased virus count during the equilibrium phase (Fig. 5a). Increasing the uninfected cell regeneration rate also contributed to increased equilibrium-phase virus count (Fig. 5b). In both the cases, the

increases in virus count and infected cell count were not linear, but showed a tendency for the rate of increase to decline gradually.

### 3.6. Infected Cell Parameters

We carried out an investigation of the effects of variation in the lifespan-shortening ratio on the virus count on the assumption that cell lifespan is shortened by infection. When this ratio was increased, the virus count decreased (Fig. 5c). An extended latent period was also related to a decreased virus count (Fig. 5d). However, the virus production from infected cells led to a linear increase in the virus count (Fig. 5e).



**Fig. 6.** (a) Increasing the infection rate increased the virus count in equilibrium periods, but the virus count did not change at infection rates of 30% or more. (b) The size of the simulation space increased not only virus count but also the cell count; however, (c) when virus and cell counts were divided by the total number of grids in the space, they were constant for all space sizes. (d) Changing the lifespan and regeneration rate of uninfected cells in opposite directions at the same time makes it possible to change only the cell cycle speed without altering the uninfected cell count. (e) When the cell cycle speed was reduced, the virus count increased toward the right of the graph. This may be because the effect of extending the lifespan of cells exceeds that of reducing their regeneration rate. (a–c and e) Black circles: virus count; line: virus count approximation curve; white bars: uninfected cell count; black bars: infected cell count.

### 3.7. Infection Rate and Space Size

Increasing the infection rate caused an increase in the virus count, but the change was minimal at an infection rate of 30% or more. The same results were seen for infected cell count, but a decrease in uninfected cell count resulted in a tendency for the infection rate to decrease by up to 60% (Fig. 6a).

The larger the space, higher the increase in both virus and cell counts (Fig. 6b). This increase was proportional to space size, how-

ever, when virus and cell counts were divided by the total number of grids in the space they were all constant (Fig. 6c).

### 3.8. Cell Cycle Speeds

Running a simulation with the initial virus count set to zero enables only the equilibrium condition for uninfected cells to be simulated. Changing the lifespan and regeneration rate of uninfected cells in opposite directions at the same time makes it possible

to change the cell cycle speed without altering the uninfected cell count (Fig. 6d). We used this technique to investigate how changing the cell cycle speed affected the equilibrium phase. Fig. 6e shows the results. Cell lifespan increases while the cell cycle speed declines. The equilibrium virus count increased in accordance with slower cell cycle speeds.

#### 4. Discussion

In this study, we investigated the models using two agent-based simulation methods to program a simple virus–host chronic infection model. The same model written in two different programming language systems displayed the same results. The transient phase was unlike that seen in a mathematical simulation with no overshoot in virus count, but rather a smooth transition to the equilibrium phase. The virus count at the start of the simulation only had effect on the rate of infection development. Increases in virus lifespan, uninfected cell lifespan, uninfected cell regeneration rate, virus production count from infected cells, and infection rate all led to increased equilibrium-phase virus count. Rises in the infected cell lifespan-shortening ratio, latent period, and cell cycle speed decreased the equilibrium-phase virus count. The size of the space itself had no innate effect on the equilibrium phase, but a speed of movement of the virus that was twice the size of the space produced the maximum virus count.

Reproducibility is the basis for all scientific study, but there are many problems to prove it in computer simulations, such as programming bugs. As agent-based simulation deals with numerous agents individually, it requires vast amounts of calculations. Accumulation of very small change of values leads to large differences of results. In this study, we investigated two programs based on two programming languages to confirm the reproducibility of our simulation results in different programming languages. The results of two simulations were consistent, but in StarLogo, the lifespan parameters had a tendency to be lower than when they were set while simulations were actually in progress. This may be because the number of digits used in calculations was different between the two programs. RePast performs calculations to at least eight decimal places. In StarLogo, the library settings only enable settings to be made up to five decimal places. It is probable that these small differences accumulate during repeated calculations and are reflected in the simulation. Ultimately, we confirmed that the differences in results obtained by using different libraries and programming languages were not innate and by making the parameters consistent during simulation, consistent results were obtained.

Mathematical models using formulae for HIV therapy was published in 1994, the method has since been applied to HBV and HCV (Ho et al., 1995; Nowak et al., 1996; Neumann et al., 1998), and they were thought to be good reflections of the reality. In the mathematical model, viruses and cells are conceived as individuals in the concept itself, but both of them are perceived *en masse* when calculations are performed. However a feature of the agent-based simulation is that it deals with individual viruses and cells as separate agents. By moving each agent individually, it probes the factors influencing overall shifts from the micro viewpoint. When the space is viewed as a whole, it is possible to watch on the screen the collective movement of groups of agents. Recently, models that provide a visual representation of Epstein–Barr virus and HIV infection have been reported, both of which are useful for an instinctive and intuitive understanding (Duca et al., 2007; Shapiro et al., 2008; Castiglione et al., 2007).

In agent-based simulation model, virus count transit smoothly to the equilibrium phase. On the other hand, virus counts overshoot during transient phase in mathematical model. We think this difference is derived from technicality of different model-

ing. The difference in concepts between mathematical models and agent-based models is the space. The mathematical model has no space in concept, but agents move across the space in the agent-based model. In agent-based models, the densities of virus and cells change overtime especially in the transition phase because of the limited space. These changes of the densities of virus and cells lead to the dynamic change of the encounter rate of viruses and cells. The mathematical model does not make such concept of the density; the encounter rate is constant. This may be the reason for the difference between two models in the transition phase. Since no overshoot of virus counts in transient phase had been reported from in vivo studies of hepatitis C virus and simian immunodeficiency virus (Dahari et al., 2005; Nowak et al., 1997), agent-based model correlates with actual biology in vivo at least for these viruses. The increase of initial virus count at the start of simulation correlates with higher encounter rate of viruses and cells which make the linear increasing of infection forming rate. Mathematical model can only express the infection formation rate as “infected or not”.

The importance of viral passing speed in the agent-based model is also explained by the “space”. Although the virus actually moves through the blood stream in our body and virus could not decide their moving speeds by themselves, there is most appropriate speed for virus to meet the cells on the simulation space by the highest probability. The effect of cell cycle speed should be mentioned by another affection of the space. A fast cell cycle speed means that the lifespan of uninfected cells is short. Then fast cell cycle speed leads to the short lifespan of infected cells. A higher regeneration rate for uninfected cells results in a higher rate of infection among uninfected cells by viruses, but in situations where viruses and cells are dispersed around the space this is ineffective in increasing the infection rate, as the latter depends on the probability that they will encounter one another. As a result, the infected cell count decreases during the equilibrium phase, as does the virus count.

In this study, we confirmed the reproducibility and usability of agent-based models in expressing the interaction between viruses and cells. A feature of this simulation system is that it uses the concept of space as actual space, which means that the existence of the space becomes an additional controlling factor on the simulation results. This is a concept that is absent from mathematical models. The reality is that we have a spatial existence, and an advantage of the agent-based simulation system is the fact that it accounts for the space. Another feature of the simulation system is that it enables the condition to be perceived in visual terms, making it easy to understand. However it may be affected by computer performance and by the limitations of programming languages or the program itself, this system may offer a powerful tool for the future analysis of real virus–host interaction disease.

#### Conflict of interest

No conflicts of interest exist for all authors.

#### References

- Castiglione, F., Pappalardo, F., Bernaschi, M., Motta, S., 2007. Optimization of HAART with genetic algorithms and agent-based models of HIV infection. *Bioinformatics* 23, 3350–3355, doi:10.1093/bioinformatics/btm408.
- Dahari, H., Major, M., Zhang, X., Mihalik, K., Rice, C.M., Perelson, A.S., Feinstone, S.M., Neumann, A.U., 2005. Mathematical modeling of primary hepatitis c infection: noncytolytic clearance and early blockage of virion production. *Gastroenterology* 128, 1056–1066, doi:10.1053/j.gastro.2005.01.049.
- Duca, K.A., Shapiro, M., Delgado-Eckert, E., Hadinoto, V., Jarrah, A.S., Laubenbacher, R., Lee, K., Luzuriaga, K., Polys, N.F., Thorley-Lawson, D.A., 2007. A virtual look at Epstein–Barr virus infection: biological interpretations. *PLoS Pathog.* 3, 1388–1400, doi:10.1371/journal.ppat.0030137.
- Gilbert, N., Banks, S., 2002. Platforms and methods for agent-based modelling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (Suppl. 3), 7197–7198.

- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M., 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373, 123–126, doi:10.1038/373123a0.
- Naniche, D., 2009. Human immunology of measles virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 330, 151–171.
- Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J., Perelson, A.S., 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282, 103–107, doi:10.1126/science.282.5386.103.
- Nowak, M.A., Bonhoeffer, S., Hill, A.M., Boehme, R., Thomas, H.C., McDade, H., 1996. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4398–4402.
- Nowak, M.A., Lloyd, A.L., Vasquez, G.M., Wiltrout, T.A., Wahl, L.M., Bischofberger, N., Williams, J., Kinter, A., Fauci, A.S., Hirsch, V.M., Lifson, J.D., 1997. Viral dynamics of primary viremia and antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 71, 7518–7525.
- Shapiro, M., Duca, K.A., Lee, K., Delgado-Eckert, E., Hawkins, J., Jarrah, A.S., Laubenschlager, R., Polys, N.F., Hadinoto, V., Thorley-Lawson, D.A., 2008. A virtual look at Epstein-Barr virus infection: simulation mechanism. *J. Theor. Biol.* 252, 633–648, doi:10.1016/j.jtbi.2008.01.032.
- See, H., Wark, P., 2008. Innate immune response to viral infection of the lungs. *Paediatr. Respir. Rev.* 9, 243–250, doi:10.1016/j.prrv.2008.04.001.