

パール)は分子量637.03 g/molの低分子化合物である。分子量の大きい抗体薬にはベザシズマズ(アバチン)やセツキシマブ(アービタックス)などがあるが、肝細胞癌に対して有用性が示された薬剤はまだ報告されていない。低分子化合物においては、物質名の語尾に~ibとついているものはinhibitor(阻害薬)を意味している。薬物動態的には同じ血管新生阻害薬であっても抗体はもともと体内に存在するため、抗体薬は血液中で安定であり、そのため小分子化合物と比較して半減期が長くなる。ソラフェニブは小分子化合物のため半減期が24~48時間であり、基本的に連日内服を必要とする。

## 2. 従来との抗がん剤との違い(有効性の評価・投与量・副作用)

### 1) 有効性の評価

従来の殺細胞性抗がん剤の有効性の評価には、画像治療効果判定としてWHO基準<sup>1)</sup>やRECIST基準<sup>2)</sup>が用いられ、いずれも腫瘍径の変化や新病変に応じてCR(complete response: 著効)・PR(partial response: 有効)・SD(stable disease: 不変)・PD(progressive disease: 進行)と判定されてきた。しかしながら静細胞性抗がん剤である分子標的薬では、腫瘍径は大きな変化を認めず腫瘍内血流やCT値(density)が変化する症例が多いことが特徴であり、従来の腫瘍径のみを評価項目とした画像診断基準では評価が困難である。現在では、後述のごとく肝細胞癌では腫瘍濃染に着目したmodified RECIST基準<sup>3)</sup>が用いられている。ソラフェニブ内服後CR(著効: 腫瘍消失)はきわめてまれであり、第III相試験(SHARP study<sup>4)</sup>, Asian-Pacific study<sup>5)</sup>)では両試験ともに0例である。本邦においては正確な把握な困難だが1万例程度のネクサパール内服症例においてCR例は数十例のみ報告されている。よって分子標的治療のポイントとしては従来の殺細胞性抗がん剤治療とは異なる基準で、有効性の評価をすることが重要である。すなわちPRまたはSDであれば有効と判定し、副作用を最大限にコントロー

ルしながら、可能な限り内服を継続することが望ましい。

### 2) 投与量

従来の抗がん剤では有害事象を指標として最大耐用量(maximum tolerated dose: MTD)を決定し推奨量(recommended dose: RD)が決定されていた。一方分子標的薬では、治療域と有害事象発現域とが必ずしも近接しておらず、そのため治療効果と有害事象、さらに前臨床試験により得られたデータを総合的に解釈してRDを決定する。ソラフェニブの第III相試験は本邦では実施されていないが、SHARP studyおよびAsian-Pacific studyのデータによりRDは800 mg 2×/dayと決定された。

### 3) 副作用

分子標的薬は、がん細胞が特異的あるいは過剰に発現している分子を標的としているが、標的分子の多くは必ずしもがん特有のものではないため、正常細胞にも影響を及ぼす。したがって従来の殺細胞性抗がん剤ではほとんどみられなかった、血圧上昇・手足症候群・下痢・アミラーゼ上昇・肝機能障害などといった副作用が出現する(後述)。分子標的治療においては効果を示す薬剤を長期に内服することが長期生存につながり、従来の殺細胞性抗がん剤以上に副作用マネジメントが重要である。

## II. 肝細胞癌に対する分子標的薬のエビデンス

ソラフェニブ(ネクサパール)は経口のマルチキナーゼ阻害薬である。当初は細胞内キナーゼであるc-RAFなどのセリン・スレオニンキナーゼ活性の阻害薬として研究されていたが、その後受容体型チロシンキナーゼであるc-KIT, VEGFR(vascular endothelial growth factor receptor)-2, PDGFR(platelet derived growth factor receptor)-βなどのチロシンキナーゼ活性も阻害することが証明された。よってネクサパールは腫瘍細胞内のMAPキナーゼカスケードにおける細胞増殖因子シグナル伝達を阻害することによる増殖抑

制効果と血管内皮細胞・周皮細胞に働き血管新生を抑制する効果をもたらすと考えられている。ソラフェニブ第III相臨床試験SHARP studyではChild Aの肝癌患者602例を対象として、ソラフェニブ経口投与群(800 mg/day)299例とプラセボ投与群303例にランダム化割りつけて検証した。その結果、全生存期間(overall survival: OS)中央値ではソラフェニブ投与群10.7ヵ月 vs プラセボ群7.9ヵ月(HR=0.69, p<0.001), 無増悪期間(time to progression: TTP)もソラフェニブ投与群5.5ヵ月 vs プラセボ群2.8ヵ月(HR=0.58, p<0.001)であり、進行肝細胞癌に対するソラフェニブの有効性が科学的に証明された。

SHARP studyは欧州・北南米・豪州を中心に行われたが、台湾・中国・韓国における第IIIランダム化試験(Asian-Pacific study)でもほぼ同様な結果が得られている(OSのHR=0.68, p=0.001およびTTPのHR=0.57, p<0.001)。

### III. 肝細胞癌症例における分子標的薬の適応は?

現時点での本邦でのソラフェニブの保険適応は、切除や局所治療が困難なChild-Pugh Aの進行肝細胞癌とされている。この適応はソラフェニブの有効性が証明されたSHARP studyおよびAP studyに基づいており、現在進行中の臨床試験(局所根治後の補助療法など)の成績が明らかとなるまでは、現在の適応を遵守すべきである。TACE不能例・不応例については肝癌診療マニュアル<sup>6)</sup>に表1のように定義されており、とくにTACE不能例については分子標的薬の適応と考えられる。肝外病変のない進行肝細胞癌については動注療法と分子標的治療の治療選択が本邦では問題となるが、今のところ明確なエビデンスはなく、現在進行中の臨床研究の結果が待たれるところである。

ソラフェニブは上述したようにCR, PRが少なく、切除へ移行できる症例は少ないと思われるが、興味ある症例を提示する。80歳代男性で、左

表1 TACE不能と不応の定義(文献6より)

～TACE不能の定義～	
1.	治療血管が荒廃し、栄養血管にカテーテル選択不能
2.	治療を繰り返し、Child-Pugh分類「C」に肝機能が悪化
3.	Vp3 & 4 症例
4.	巨大A-Pシャント症例
～TACE不応の定義～	
①	肝内病変
i)	TACEを適切に施行したにもかかわらず、直後(ただし、1ヵ月以後)の治療効果判定のCTにてリビオドールの沈着が不良(50%以下)の場合が、2回以上続く。
ii)	TACE施行直後(ただし1ヵ月以後)の治療効果判定のCTにて、すぐに新病変が多数出現する場合は2回以上続く。
②	脈管浸潤の出現
③	遠隔転移の出現
④	腫瘍マーカー
	TACEの施行直後にもかかわらず、腫瘍マーカーの一過性の低下のみで上昇傾向が続く。

葉に大きな肝細胞癌があり、右葉にも多数の肝細胞癌と考えられる多血性小結節が認められた。ソラフェニブを投与したところ、右葉の病変は画像上消失し、左葉の主病変も縮小し、一部壊死も観察された。肝機能良好なことから、切除の方針とし、左葉切除を施行した。門脈左枝から門脈左右分岐部近傍まで癌が及んでいたため、門脈右枝と本幹を端端吻合で再建した。術中の造影超音波検査にても右葉の病変は認めなかった。術後順調に経過し、現在もソラフェニブを補助療法として少量内服中であり、4ヵ月間無再発中である(図1, 2, 3, 4)。

### IV. 分子標的薬(ソラフェニブ)投与前に行うべきこと

前述のように分子標的薬は長期内服が長期生存につながり、長期内服継続には医療従事者の努力のみならず、患者・家族の積極的な治療参加および副作用の理解が必須である。肝細胞癌は再発を繰り返し、本邦では分子標的薬導入例の半数以上が既治療例である。よって以前に行われた根治切除や局所療法が現在の進行状態では適応がないことをまずは明確に説明することが重要である。

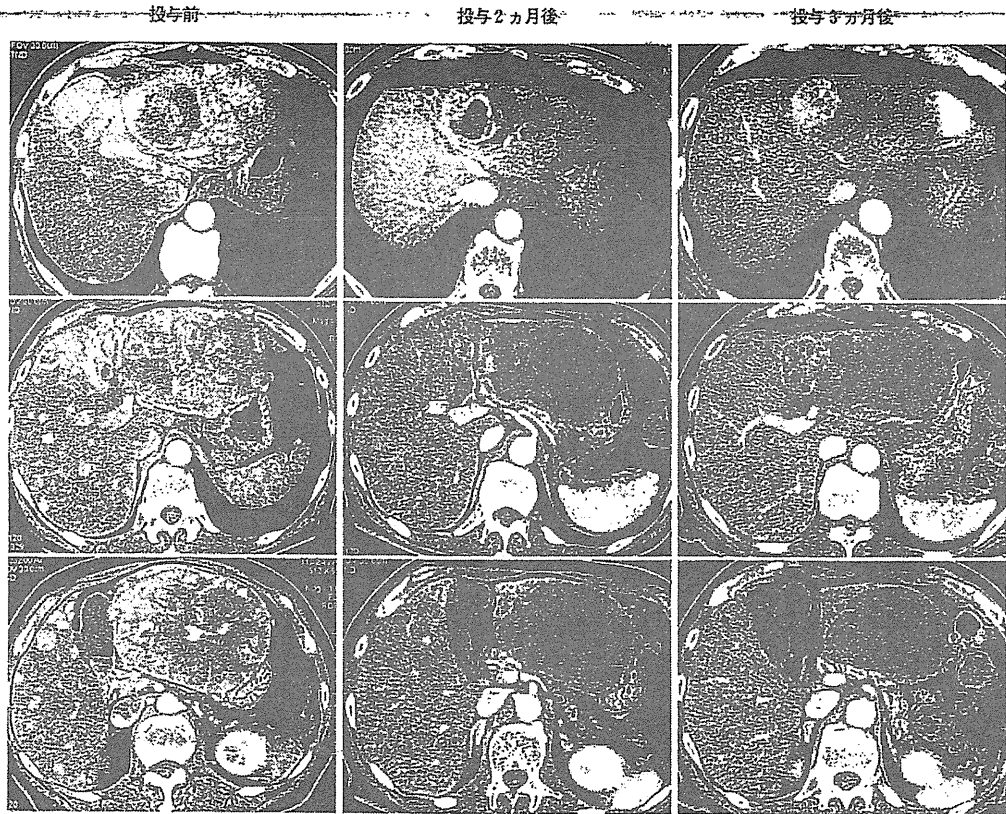


図1 ソラフェニブ投与によるCT上の変化

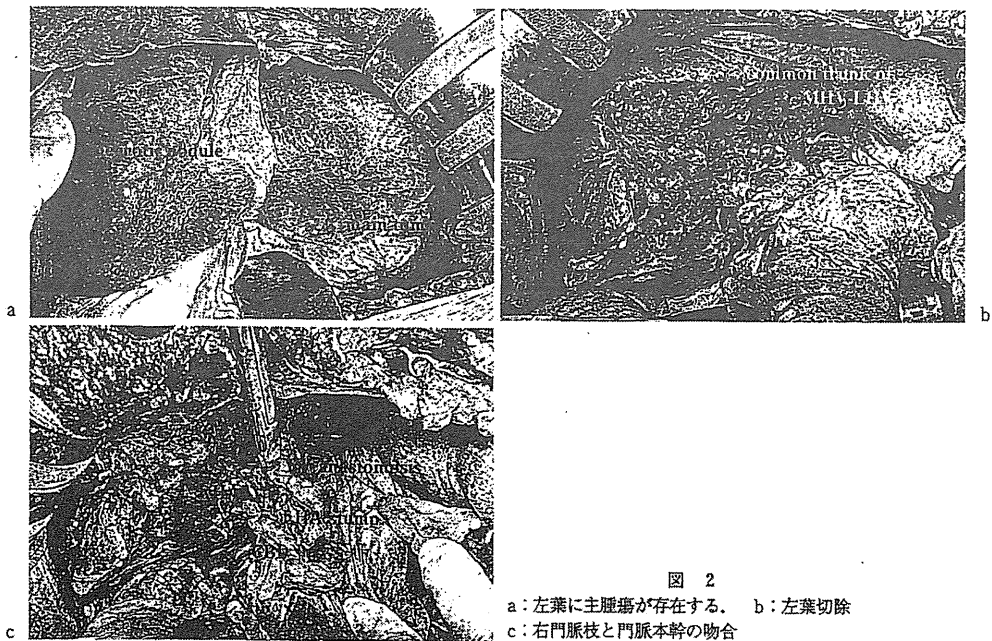


図 2

- a: 左葉に主腫瘍が存在する。
- b: 左葉切除
- c: 右門脈枝と門脈本幹の吻合

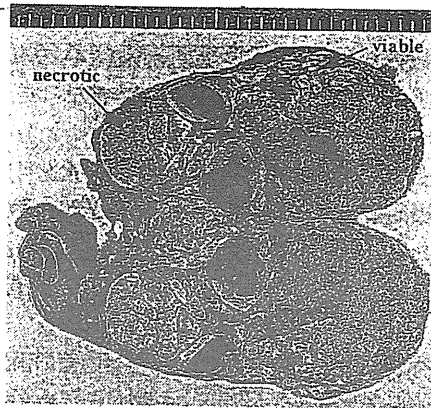


図3 切除標本  
広範な壊死が観察されるが、内側は viable である。

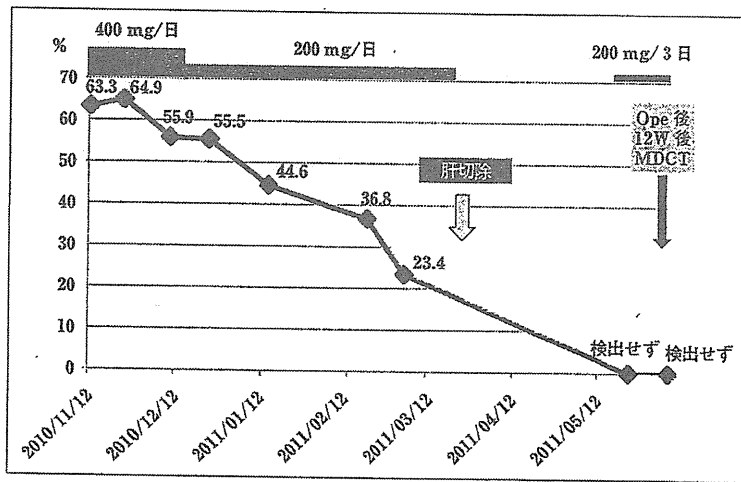


図 4

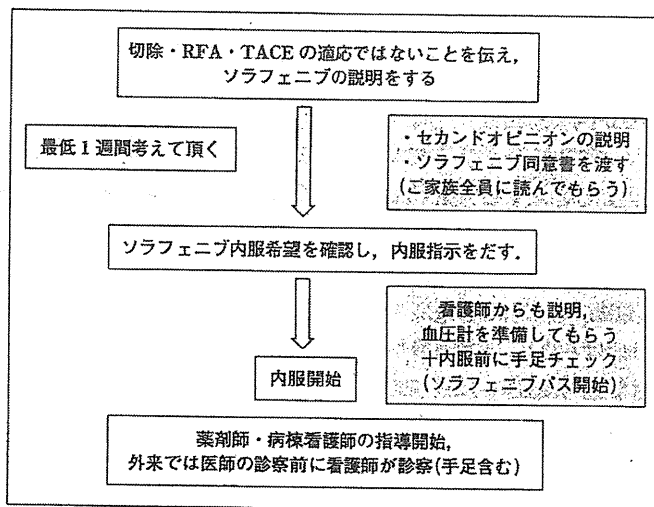


図5 武蔵野赤十字病院におけるソラフェニブ導入の実際

当院では図5に示すように、外来でまずは根治切除や局所治療の適応がないことを丁寧かつ明確に説明し、次に分子標的薬の説明パンフレットをご本人にお渡しし、1週間ご家族とともに治療導入について検討して頂き、その上で分子標的薬開始同意を頂いている。また分子標的薬の手足症候群(後述)は荷重部に皮疹がでるため、治療前に鶏眼(ウオノメ)などがある場合はその治療を行ってからソラフェニブを開始している。また足白癬(水虫)がある場合はその治療を行い、亀裂や皮膚の乾燥があれば保湿剤(ウレパールクリームやケラチナミンコーワ軟膏など)をソラフェニブ治療前から外用することが大切である。当院では医師・看護師・薬剤師がそれぞれに役割分担をし、ソラフェニブ導入前から上記のような介入を行っている。

#### V. 分子標的薬の投与開始用量は？

ソラフェニブの通常内服用量は添付文書では800 mg 2 ×/day であり、この分量は第III相臨床試験に基づくものである。一方、日本および韓国で施行されたTACE施行後の進行肝細胞癌患者におけるソラフェニブの有用性の検討では、サブグループ解析でTTPの延長が得られた韓国のデータにおいて、1日服用量(中央値)は約400 mg である(服薬継続期間の中央値は30.9日)。副作用マネージメントから投与開始量を考えると、ソラフェニブの頻度の高い副作用である高血圧や手足症候群は大部分が内服開始後3週間以内に出現すると報告されているため、ソラフェニブ400 mg 1 ×/day から開始し漸増する方法も海外および本邦で報告されている。しかしながらエビデンスのある用量としては800 mg 2 ×/day であり、当院では、①80歳以上、②Child-Pugh 7点の既往あり(投与開始直前は6点)、③食道静脈瘤F2以上、④腹水・肝性脳症の既往あり(投与開始直前はなし)の場合は400 mg 1 ×/day から開始し、それ以外の患者さんでは800 mg 2 ×/day から開始している。当院のソラフェニブ導入80例の

データでは400 mg 開始群と800 mg 開始群にOSおよびTTPの有意差は現時点では認めておらず、CRとなった1例は400 mg 開始群の80歳代女性であった。分子標的治療では内服用量とともに副作用中止を可能な限り回避し、投与期間を担保することが非常に重要である。

#### VI. 分子標的薬の効果判定(画像評価)

分子標的薬の画像上の特徴として、腫瘍径は大きな変化を認めず腫瘍内血流やCT値(density)が変化する症例が多いことがあげられ、従来の腫瘍径のみを評価項目とした画像診断基準では評価が困難である症例が少なからず存在する。そこで新しい画像診断基準としてLencioniらがmodified RECIST基準を提唱した。Modified RECIST基準では評価項目は単なる腫瘍径ではなく、造影CTまたはMRIの動脈優位相で濃染する部分(viable lesion)の変化を評価するものとなっている。本邦では日本肝癌研究会の肝癌集学的治療効果判定基準作成委員会により肝癌局所治療後評価として造影効果を評価項目としたRECICL基準<sup>7)</sup>が提唱されている。最近ソラフェニブ投与例におけるmodified RECIST基準による画像評価と予後についての報告がなされており、CR+PR例では有意にOSやTTPが良好であった。現在は進行肝細胞癌におけるソラフェニブ治療においてはmodified RECIST基準で画像評価を行うことが標準的である。

Modified RECIST基準やRECICL基準で問題となるのは、治療前から動脈優位相で非濃染部を含む非典型的肝細胞癌の治療効果判定である。Modified RECIST基準には動脈優位相で濃染する典型的な肝細胞癌のみに適応されると明記されている。とくに分子標的薬が適応となるような進行肝癌は腫瘍径が大きいものが多く、治療前より壊死部と考えられる動脈優位相非濃染部を含む場合が少なくない。また低分化型肝細胞癌などでは明らかな動脈優位相濃染像を示さない症例もあり、このような症例での分子標的薬投与開始後治

表2 各種画像診断基準

	RECIST (Ver. 1.1)	modified RECIST	RECICL	Choi criteria
評価病変	標的病変 (5 病変, 1 臓器最大 2 病変)	標的病変 (10 病変, 1 臓器最大 5 病変)	標的病変 (5 個以上の場合は 5 個まで)	標的病変 (10 病変, 1 臓器最大 5 病変)
評価方法	一方向計測 (最長径の合計の変化)	一方向計測 (最長径の合計の変化) ただし造影 CT の不染領域は壊死として計測する	二方向計測 (最長径とそれに直交する径の積の変化。ただし造影 CT における不染域や washout のないリビオドール沈着部位は壊死として記録する)	一方向計測 (最長径の合計の変化)
標的病変の評価 CR (着効)	すべての標的病変の消失	すべての腫瘍浸染の消失	腫瘍壊死効果100% または腫瘍縮小率100%	すべての標的病変の消失
PR (有効)	径和30%以上減少	viable lesion の径和 30%以上減少	腫瘍壊死効果50%以上 100%未満または腫瘍 縮小率50%以上100%未満	径和の10%以上減少または CT 値15%以上減少
SD (不変)	PR・PD 以外の効果	PR・PD 以外の効果	PR・PD 以外の効果	PR・PD 以外の効果
PD (進行)	径和20%以上増加	viable lesion の径和 20%以上の増加	壊死効果に関わらず、腫瘍 が25%以上増大	径和10%以上の増加かつ CT 値が15%以上減少し ない

療効果判定は modified RECICST 基準や RECICL 基準を用いても困難である。Choi らは 2007 年に imanitib を用いた gastrointestinal stromal tumors (GISTs) の治療効果判定において FDG-PET 所見 ( $SUV_{max}$ ) と MDCT 所見 (size と density) を比較検討し、従来の RECIST 基準よりも小さな画像変化をとらえることにより、画像治療効果判定と TTP (time to progression) が相関したと報告している。Choi criteria (表 2)<sup>9)</sup> では CR は従来通り「すべての病変の消失および新規病変なし」と定義しているが、PR は 10% 以上の size 縮小または 15% 以上の CT 値 (HU: Hounsfield unit) の減少、PD は 10% 以上の size 増大かつ 15% 以上の CT 値の減少がないもの (PR の CT 値基準を満たさないもの) や新病変の出現、SD は CR・PR・PD の基準も満たさないものと定義している。新病変の評価は従来通りであるが、標的病変の評価は明らかに RECIST 基準や modified RECIST 基準と比較して Choi criteria では PR 判定症例が多くなるのが予想される (RECIST 基準の PR は 30% 以上減少)。肝細胞癌のソラフェニブ治療における Choi criteria の有用性についての論文ははまだ報告されていない

いが、Kim らは Sorafenib 治療を施行した 28 症例の画像変化として Sorafenib 投与前 2 週間以内・投与開始 1・3・5 ヶ月後に 4 相 CT を撮像し、その結果として RECIST 1.1 基準で判断される腫瘍径の有意な減少はなく、一方、CT 値の有意な減少を認めたと報告している。これらの知見をふまえると今後は腫瘍全体や viable lesion のサイズだけではなく CT 値の変化が分子標的薬治療効果判定に有用であると考えられる。

## VII. 分子標的薬の効果判定 (腫瘍マーカー)

ソラフェニブ投与例では投与後早期に PIVKA-II が上昇する症例が多い<sup>9)</sup> と報告されている。その機序については明らかではないが、血管新生阻害によると考えられる低酸素状態を反映し PIVKA-II 産生が亢進することも考えられている。しかしながらソラフェニブ無効で PIVKA-II が上昇する例も存在し、ソラフェニブ投与例においては PIVKA-II の増減で有効性を評価することが困難である。少なくとも PIVKA-II が投与後上昇=無効と考えるべきではない。AFP については早期の AFP 減少がソラフェニブ内服後の予後因子と

なるなどの少数例での報告がなされている<sup>10)</sup>が、ソラフェニブ内服後早期に AFP が減少する例自体が少数であり、long SD を維持し OS をのばしているという評価を従来の腫瘍マーカー (AFP, PIVKA-II) で行うことは困難である。現在さまざまなバイオマーカーが検討されており、今後の報告が期待される。

## VIII. 分子標的薬の副作用マネジメント

### 1. 高血圧

海外第 III 相試験については 5.1% に認められ、投与開始 12 週以内の発現が大多数と報告されている。当院では高血圧発現例は投与 1 日後から 2 週間以内にすべて発現し、ソラフェニブ投与開始前にすでに降圧剤を内服している症例では全例で降圧剤の追加が必要であった。よって当院ではとくにソラフェニブ投与前に降圧剤を内服している患者さんには降圧剤追加が必要となる可能性が高いことをあらかじめ説明している。当院では基本的にソラフェニブ内服開始前に血圧測定器を準備して頂いている。自分で毎日血圧を測定し日誌に記入することを指導することも非常に重要である。

### 2. 手足症候群

分子標的薬で生じる手足症候群は、手掌・足底の荷重部に限局性の紅斑や著明な角化がみられ、進行すると水疱や膿疱を形成し、生活に支障をきたす(箸が持てない・歩けないなど)副作用である。生命を脅かすことは少ないが患者さんの生活の質をきわめて低下させる。症状は用量依存性といわれており、薬剤の中止により症状はすみやかに軽快する。多くは投与開始後 3 週間以内に発症し、比較的投与初期に発現することが多いとされている。一方で当院では手足症候群以外の理由で休薬した後の再開時に、投与開始後早期には認められなかった手足症候群を発現した患者さんを経験している。よってソラフェニブ内服中は少なくとも 1 日 1 回は自分で手足の状態を観察し、かつ保湿剤を十分量(皮膚が若干光沢をもつ程度)に塗布す

るように指導することが大切である。とくに皮膚症状は一日単位で悪化することも多く、増悪時には早めにソラフェニブを減量あるいは休薬し皮膚科医にコンサルトすることがポイントである。

### 3. 下痢

下痢に関しては整腸剤などでコントロールできるものであれば減量は不要であるが、明らかに生活の質を低下させたり、血清アルブミン濃度が低下するような症例では減量が望ましい。AP study ではソラフェニブ投与群の 30.9% の症例で有害事象のため減量が必要となり、減量症例のそれぞれ約 1/3 が手足症候群と下痢が原因とされているが、減量により投与継続可能であった症例が多いと報告されている。

### 4. 消化管出血

消化管出血は SHARP 試験で 10 例 3.4%、AP 試験では 4 例 2.7% にみられ、前者では死亡例も 2 例含まれている。このため症例によっては事前の上部消化管内視鏡検査や予防的抗潰瘍剤の投与を考慮する必要がある。当院でも消化管出血を数例経験しているが、①出血症状があればただちにソラフェニブ内服をいったん中止する、②Hb 低下が軽度でも基本的には入院管理とする、③必要時は輸血を施行する、④ソラフェニブ再開時には出血前よりも低用量で再開し厳重な外来 follow を行う、ことにより long SD を維持している症例も存在する。

### 5. 膵外分泌異常(高アミラーゼ・高リパーゼ血症)

チロシンキナーゼ阻害薬であるソラフェニブでは高頻度の膵酵素異常が報告されているが発生機序に関しては不明である。抗 VEGF 作用による血流障害の可能性も考えられているがすべての血管新生阻害薬で膵酵素の異常が認められるわけではない。殺細胞性抗がん剤では、膵外分泌異常や膵炎の発症はまれであることから、シグナル伝達経路との関連が示唆されている。SHARP study

での全グレードでの高アマラーゼ血症は34%と頻度は高いが、膵炎の頻度は0.3%と低く、臨床的に問題となることは少ない。しかしながら腹部症状を伴えばソラフェニブを中止し、通常の急性膵炎に準じた診断および治療を行うことが必要である。

### IX. 肝細胞癌治療における分子標的薬のこれから

ソラフェニブは進行肝細胞癌における化学療法において、現時点では唯一世界的なエビデンスのある薬剤である。しかしながら GIDEON study<sup>11)</sup>の結果から各国(とくに欧米)と本邦では同じ

Child-Pugh A 症例であってもソラフェニブ導入時の治療歴・治療内容・治療回数が大きく異なることが判明した。したがって欧米からのデータを参考にしつつ、日本の患者さんにあったソラフェニブ治療を確立していく必要がある。一方で現在ソラフェニブ以外の分子標的薬として複数の薬剤が臨床第 III 相試験に進んでおり、またソラフェニブに殺細胞性抗がん剤を併用する臨床研究も多数進行中である。進行肝細胞癌症例における分子標的薬を含む化学療法は今後最も発展が期待される分野の一つであり、われわれは「長期生存と高い生活の質」を目標に前進していくことが必要である。

#### 文 献

- 1) AB MILLER, FRCP (C), B HOOGSTRATEN, A WINKLER, et al: Reporting Results of Cancer Treatment. *Cancer* 47: 207-214, 1981.
- 2) Patrick Therasse, Susan G Arbuck, Steve G Gwyther, et al: New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. *J Natl Cancer Inst* 92: 205-216, 2000.
- 3) R Lencioni, JM Llovet: Modified RECIST (mRECIST) Assessment for Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis* 30: 52-60, 2010.
- 4) Josep M Llovet, Sergio Ricci, Jordi Bruix, et al: Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 359: 378-390, 2008.
- 5) Ann-Lii Cheng, Yoon-Koo Kang, Zhongzhen Guan, et al: Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 10: 25-34, 2009.
- 6) 日本肝臓学会編: 肝臓診療マニュアル第2版. 医学書院, 東京, 2010.
- 7) 工藤正俊ほか: 肝臓治療効果判定基準(2009年改訂版). *肝臓* 51: 261-266, 2010.
- 8) Haesun Choi, Chuslip Charmsangavej, Robert S Benjamin, et al: Correlation of Computed Tomography and Positron Emission Tomography in Patients With Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor Treated at a Single Institution With Imatinib Mesylate: Proposal of New Computed Tomography Response Criteria. *J Clin Oncol* 25: 1753-1759, 2007.
- 9) 葛谷貞二, 土谷 薫, 泉 並木ほか: 進行肝細胞癌のソラフェニブ投与における PIVKA-II の意義. *肝臓* 51(7): 493-404, 2010.
- 10) Yu-Yun Shao, Zhong-Zhe Lin, Ann-Lii Cheng, et al: Early Alpha-Fetoprotein Response Predicts Treatment Efficacy of Antiangiogenic Systemic Therapy in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Cancer* 116(19): 4590-4596, 2010.
- 11) R Lencioni, J Marrero, M Kudo, et al: Design and rationale for the non-interventional Global Investigation of therapeutic decisions in hepatocellular carcinoma and of its treatment with sorafenib (GIDEON) study. *Int J Clin Pract* 64(8): 1034-1041, 2010.



和田 秀一

長野赤十字病院 消化器内科部長

本邦における急性ウイルス性肝炎の発生状況についての疫学的研究

研究分担者 和田秀一 長野赤十字病院

研究要旨

B型急性肝炎は Genotype A が増加し、感染の経路が変化している。ウイルス性肝炎、特に B 型急性肝炎の発生、蔓延状況、予後を明らかにするために、全国の赤十字病院への急性ウイルス性肝炎疫学調査を行い、本邦における急性ウイルス性肝炎の実態を明らかにし、universal vaccination の妥当性についても検討した。

A. 研究目的

母子感染、輸血後肝炎の制御により B 型肝炎ウイルス（HBV）キャリアは減少したが、最近本邦では Genotype A の増加など感染の経路が変化し B 型急性肝炎は増加している。本邦における急性ウイルス性肝炎、特に B 型急性肝炎の発生とその蔓延状況、臨床経過を明らかにし、universal vaccination の導入の必要性も検証する。

B. 研究方法

平成 23 年度の本研究事業発足後、2 回の班会議を経てアンケート調査項目を検討し、同年 12 月末に全国 46 施設の赤十字病院あてにアンケート

（Excel file）を送付し、平成 23 年 1 月から 12 月までの急性ウイルス性肝炎患者を対象に結果を回収し検討した。

なお、研究にあたっては個人情報管理に十分留意し、data は全て匿名化した。また、報告された内容は全て通常診療で必要な内容に留めた。なお、本研究の実施にあたっては各医療機関における生命倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

平成 23 年 2 月 6 日現在で計 20 施設より結果を回収した。A 型急性肝炎は 5 例、B 型急性肝炎は 47 例、C 型急性肝炎は 6 例、E 型急性肝炎は 4 例の報告があった。

A 型急性肝炎の劇症化はなく、特に目立った傾向はなかった。

B 型急性肝炎は男性 40 例、女性 7 例と有意に男性例に多く、平均年齢は 36.9 才、最低 17 才最高 69 才であった。Genotype 測定は 38 例に行われ、A21 例、B3 例、C14 例で、A が過半数を占めた。感染経路は性行為 30 例、不明 16 例、医療行為 1 例であった。性行為感染では異性間の感染 20 例、同性間の感染 9 例、不明 1 例で、同性間では 9 例中 8 例が Genotype A、異性間では 14 例中 6 例が Genotype A であった。慢性化は Genotype C で 1 例に認められた。劇症化は Genotype C で 1 例に認められ、死亡例している。（表）

また、Genotype A の感染は東京、大阪、名古屋、福岡、京都、神戸などの大都市で 15 例と多かったが、長崎、松山、長野、岐阜、姫路などでも報告があり、全国に蔓延していた。

C 型急性肝炎は針刺し事故による医療者の感染が 2 例、性行為による感染が 1 例、劇症化例が 1

例認められた。

E 型急性肝炎は国内感染が 3 例、国外感染が 1 例で前者は同一施設からの報告であった。豚内臓肉、鹿生肉、イノシシ生肉の摂取があった。国内感染の 2 例は Genotype III であった。

表 急性 B 型肝炎における Genotype 別感染経路と臨床像

Genotype	A	B	C
症例数	21	3	14
平均年齢	36.2 才	40.6 才	40.9 才
男性 (例数)	20(95.2%)	3(100%)	11(78.6%)
感染経路 (例数)			
性行為	14(66.7%)	1(33.3%)	8(57.1%)
異性間	6	1	7
同性間	8	0	1
不明	7	2	5
医療行為	0	0	1
劇症化 (例数)	0	0	1
慢性化 (例数)	0	0	1
抗ウイルス療法(例数)	14	0	4

#### D. 考察

現在集計途中であるが、B 型急性肝炎に関しては Genotype A の感染が過半数を占め、特に同性間での性行為感染では 88.9% と非常に高率を示した。慢性化の比率は高くなかったが、Genotype C では劇症化による死亡例もあり、本邦での B 型肝炎ウイルス対策を考える上で重要と考えられた。また、Genotype A の感染は都市部以外にも認められ、全国的な蔓延が示唆され、universal

vaccination の必要性が考えられた。

#### E. 結論

B 型急性肝炎は Genotype A の頻度が増加し、同性間での性行為感染では特に頻度が高かった。Genotype A の感染は全国に蔓延していると考えられ、公衆行政上極めて重要な問題と考えられた。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

朝比奈 靖浩

武蔵野赤十字病院 消化器科部長

C型慢性肝炎例における宿主*IL28B*とHCVコア70、91番変異、ISDR変異の地域・年齢分布に関する研究

研究分担者名 朝比奈靖浩

所属 武蔵野赤十字病院 消化器科

研究要旨：C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果に関連する*IL28B*周辺の遺伝子多型やHCVコア遺伝子およびISDR変異等の日本国内における分布や年齢・性別による差異は十分には明らかではない。そこで本研究では、これらの知見を明らかとすることで、各地域における効率的な個別化医療への端緒を築くことを目的とした。同意を得られたC型慢性肝疾患106例において*IL28B* SNP、コア70、91番遺伝子変異とISDR変異について解析した。全国における*IL28B* nonTTの割合は46.9%で、地域別では、北海道 56.0%、東北・北関東 33.3%、関東 42.3%、近畿・中・四国 58.0%で、特に北海道および中・四国で多い傾向であった。全国ではコア変異は*IL28B*nonTTに多かったが、北海道では*IL28B* TTにコア変異が多かった。*IL28B*周辺のSNPやHCVコア遺伝子には、地域または都市毎の医療形態による差異があり、各地域における効率的な個別化医療を行う上で考慮すべきである。

#### A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロンを基盤とした治療効果に、ヒト19番染色体上の*IL28B*周辺の遺伝子多型(Nature 2009, Nat Genet 2009)やHCVコア遺伝子およびISDR変異が関連する。一方、C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果には、人種差や地域差および年齢・性別により異なることが知られているが、*IL28B*周辺の遺伝子多型やHCVコア遺伝子およびISDR変異等の日本国内における分布や年齢・性別による差異は十分には明らかではない。そこで本研究では、これらの知見を明らかとすることで、各地域における効率的な個別化医療への端緒を築くことを目的とした。

#### B. 研究方法

本試験に同意を得られたC型慢性肝疾患（慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌等）患者を対象とし、末梢血約10mlを採取し、当該施設で連結可能匿名化を行い、匿名化された試料からDNAを抽出し、疾患の病態や治療効果に関する可能性のある宿主遺伝子多型、とくに*IL28B*周辺の遺伝子多型、およびHCVウイルス変異、とくにコア70、91番遺伝子変異とISDR変異について解析した。

#### C. 研究結果

本年度は全国106例について*IL28B*の遺伝子変異を測定した。内訳は、北海道 19.8%、東北 3.8%、関東 63.2%、近畿・中国 3.8%、四国 9.4%であった。全国における*IL28B* nonTTの割合は46.9%で、地域別では、北海道 56.0%、東北・北関東 33.3%、関東 42.3%、近畿・中・四国 58.0%で、特に北海道および中・四国で多い傾向であった。*IL28B* SNPとHCVコア変異の関係を検討すると、全国ではコア変異は*IL28B*nonTTに多かったが、北海道では*IL28B* TTにコア変異が多かった。

#### D. 考察

日本人における*IL28B* nonTTの頻度は9%と報告されている(Nature 2009)。従って、全国各赤十字病院に通院中のC型慢性肝炎患者では、より難治のnonTT typeの症例が集積していると考えられる。また、今回北海道（旭川）でnonTT typeの症例が多かったが、これが人種的地域差によるものか、基幹病院に限られているという都市形態的特徴によるものかは今後の検討が必要と考えられる。

#### E. 結論

*IL28B*周辺の遺伝子多型やHCVコア遺伝子には、地域による差異があり、各地域における効率的な個別化医療を行う上で考慮すべきと考えられた。

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（肝炎関係研究分野））  
分担研究報告書

## G. 研究発表

## 学会発表

朝比奈靖造, 泉並木.

シンポジウム ウイルス性肝炎の標準治療の変遷と将来像. これまでの標準治療の成績及び発癌抑止効果の検証と新規HCV特異的阻害薬の効果.

第97回日本消化器病学会総会, 東京, 2011年5月.

朝比奈靖造, 土谷薫, 泉並木.

シンポジウム ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤. C型肝炎におけるIL28B近傍の遺伝子多型と自然免疫分子機構および発癌に与える影響.

第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011年6月.

朝比奈靖造, 加藤知爾, 泉並木.

パネルディスカッション C型肝炎治療 新たな時代へ. 特異的HCV増殖阻害剤の導入を踏まえたC型肝炎治療 発がん抑止を目指した治療戦略.

第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011年6月.

朝比奈靖造, 土谷薫, 泉並木.

シンポジウム C型肝炎治療の新たな展開. これまでの標準治療の治療効果と発癌リスクの検証に基づくC型肝炎の新規治療戦略.

第15回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011年10月.

## 論文発表

Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M:

Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors.

*J Hepatol* 54: 439-448, 2011

Itakura J, Asahina Y, Tamaki N, Hirayama I, Yasui Y, Tanaka T, Sato M, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, i Kurosaki M, Gabriel GS, Schneider GJ, Izumi N:

Changes in hepatitis C viral load during first 14 days can predict the undetectable time point of serum viral load by pegylated interferon and ribavirin therapy.

*Hepatol Res* 41: 217-224, 2011.

Tsuchiya K, Komuta M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Itakura J, Nakanishi H, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, Sakamoto M, Izumi N:

Expression of Keratin19 is Related to High Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Radiofrequency Ablation.

*Oncology* 80: 278-288, 2011.

Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N:

Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin.

*Antivir Ther* 16: 685-694, 2011.

Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada SI, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N:

Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients.

*Hepatol Int* 2011 Aug 18.

Kuzuya T, Asahina Y, Tsuchiya K, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka T, Tamaki S, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N:

Early Decrease in  $\alpha$ -Fetoprotein, but Not Des- $\gamma$ -Carboxy Prothrombin, Predicts Sorafenib Efficacy in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma.

*Oncology* 81: 251-258, 2011.

Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N:

Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response.

*Hepatology* 55: 20-29, 2012.

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

## Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in *IL28B* and viral factors

Masayuki Kurosaki<sup>1</sup>, Yasuhito Tanaka<sup>2</sup>, Nao Nishida<sup>3</sup>, Naoya Sakamoto<sup>4</sup>, Nobuyuki Enomoto<sup>5</sup>, Masao Honda<sup>6</sup>, Masaya Sugiyama<sup>2</sup>, Kentaro Matsuura<sup>2</sup>, Fuminaka Sugauchi<sup>2</sup>, Yasuhiro Asahina<sup>1</sup>, Mina Nakagawa<sup>4</sup>, Mamoru Watanabe<sup>4</sup>, Minoru Sakamoto<sup>5</sup>, Shinya Maekawa<sup>5</sup>, Akito Sakai<sup>6</sup>, Shuichi Kaneko<sup>6</sup>, Kiyooki Ito<sup>7</sup>, Naohiko Masaki<sup>7</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>3</sup>, Namiki Izumi<sup>1,\*</sup>, Masashi Mizokami<sup>2,7</sup>

<sup>1</sup>Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Department of Virology, Liver Unit, Nagoya City University, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan; <sup>3</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>4</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; <sup>5</sup>First Department of Internal Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan; <sup>6</sup>Department of Gastroenterology, Kanazawa University, Graduate School of Medicine, Kanazawa, Japan; <sup>7</sup>Research Center for Hepatitis and Immunology, International Medical Center of Japan, Konodai Hospital, Ichikawa, Japan

**Background & Aims:** Pegylated interferon and ribavirin (PEG-IFN/RBV) therapy for chronic hepatitis C virus (HCV) genotype 1 infection is effective in 50% of patients. Recent studies revealed an association between the *IL28B* genotype and treatment response. We aimed to develop a model for the pre-treatment prediction of response using host and viral factors.

**Methods:** Data were collected from 496 patients with HCV genotype 1 treated with PEG-IFN/RBV at five hospitals and universities in Japan. *IL28B* genotype and mutations in the core and IFN sensitivity determining region (ISDR) of HCV were analyzed to predict response to therapy. The decision model was generated by data mining analysis.

**Results:** The *IL28B* polymorphism correlated with early virological response and predicted null virological response (NVR) (odds ratio = 20.83,  $p < 0.0001$ ) and sustained virological response (SVR) (odds ratio = 7.41,  $p < 0.0001$ ) independent of other covariates. Mutations in the ISDR predicted relapse and SVR independent of *IL28B*. The decision model revealed that patients with the minor *IL28B* allele and low platelet counts had the highest NVR (84%) and lowest SVR (7%), whereas those with the major *IL28B* allele and mutations in the ISDR or high platelet counts had the lowest NVR (0–17%) and highest SVR (61–90%). The model had high reproducibility and predicted SVR with 78% specificity and 70% sensitivity.

**Conclusions:** The *IL28B* polymorphism and mutations in the ISDR of HCV were significant pre-treatment predictors of response to PEG-IFN/RBV. The decision model, including these host and viral factors may support selection of optimum treatment strategy for individual patients.

© 2010 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is the leading cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma worldwide [1]. The successful eradication of HCV, defined as a sustained virological response (SVR), is associated with a reduced risk of developing hepatocellular carcinoma. Currently, pegylated interferon (PEG-IFN) plus ribavirin (RBV) is the most effective standard of care for chronic hepatitis C but the rate of SVR is around 50% in patients with HCV genotype 1 [2,3], the most common genotype in Japan, Europe, the United States, and many other countries. Moreover, 20–30% of patients with HCV genotype 1 have a null virological response (NVR) to PEG-IFN/RBV therapy [4]. The most reliable method for predicting the response is to monitor the early decline of serum HCV-RNA levels during treatment [5] but there is no established method for prediction before treatment. Because PEG-IFN/RBV therapy is costly and often accompanied by adverse effects such as flu-like symptoms, depression and hematological abnormalities, pre-treatment predictions of those patients who are unlikely to benefit from this regimen enables ineffective treatment to be avoided.

Recently, it has been reported through a genome-wide association study (GWAS) of patients with genotype 1 HCV that single nucleotide polymorphisms (SNPs) located near the *IL28B* gene are strongly associated with a response to PEG-IFN/RBV therapy in

**Keywords:** *IL28B*; ISDR; Peg-interferon; Ribavirin; Data mining; Decision tree.  
Received 14 March 2010; received in revised form 22 June 2010; accepted 7 July 2010; available online 19 September 2010

\* Corresponding author. Address: Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, 1-26-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180-8610, Japan. Tel.: +81 422 32 3111; fax: +81 422 32 9551.

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



## Research Article

Table 1. Baseline characteristics of all patients, and patients assigned to the model building or validation groups.

	All patients n = 496	Model group n = 331	Validation group n = 165
Gender: male	250 (50%)	170 (51%)	80 (48%)
Age (years)	57.1 ± 9.9	56.8 ± 9.7	57.5 ± 10.2
ALT (IU/L)	78.6 ± 60.8	78.1 ± 61.4	79.7 ± 59.6
GGT (IU/L)	59.3 ± 63.6	58.9 ± 62.0	60.2 ± 66.9
Platelets (10 <sup>9</sup> /L)	154 ± 53	153 ± 52	154 ± 56
Fibrosis: F3-4	121 (24%)	80 (24%)	41 (25%)
HCV-RNA: >600,000 IU/ml	409 (82%)	273 (82%)	136 (82%)
ISDR mutation: ≤1	220 (88%)	290 (88%)	145 (88%)
Core 70 (Arg/Gln or His)	293 (59%)/203 (41%)	197 (60%)/134 (40%)	96 (58%)/69 (42%)
Core 91 (Leu/Met)	299 (60%)/197 (40%)	200 (60%)/131 (40%)	99 (60%)/66 (40%)
<i>IL28B</i> : Minor allele	151 (30%)	101 (31%)	50 (30%)
SVR	194 (39%)	129 (39%)	65 (39%)
Relapse	152 (31%)	103 (31%)	49 (30%)
NVR	150 (30%)	99 (30%)	51 (31%)

ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; ISDR, interferon sensitivity determining region; Arg, arginine; Gln, glutamine; His, histidine; Leu, leucine; Met, methionine; Minor, heterozygote or homozygote of minor allele; SVR, sustained virological response; NVR, null virological response.

Japanese [6], European [7], and a multi-ethnic population [8,9]. The last three studies focused on the association of SNPs in the *IL28B* region with SVR [7–9] but we found a stronger association with NVR [6]. In addition to these host genetic factors, we have reported that mutations within a stretch of 40 amino acids in the NS5A region of HCV, designated as the IFN sensitivity determining region (ISDR), are closely associated with the virological response to IFN therapy: a lower number of mutations is associated with treatment failure [10–13]. Amino acid substitutions at positions 70 and 91 of the HCV core region (Core70, Core91) also have been reported to be associated with response to PEG-IFN/RBV therapy: glutamine (Gln) or histidine (His) at Core70 and methionine (Met) at Core91 are associated with treatment resistance [4,14]. The importance of substitutions in the HCV core and ISDR was confirmed recently by a Japanese multicenter study [15]. How these viral factors contribute to response to therapy is yet to be determined. For general application in clinical practice, host genetic factors and viral factors should be considered together.

Data mining analysis is a family of non-parametric regression methods for predictive modeling. Software is used to automatically explore the data to search for optimal split variables and to build a decision tree structure [16]. The major advantage of decision tree analysis over logistic regression analysis is that the results of the analysis are presented in the form of flow chart, which can be interpreted intuitively and readily made available for use in clinical practice [17]. The decision tree analysis has been utilized to define prognostic factors in various diseases [18–25]. We have reported recently its usefulness for the prediction of an early virological response (undetectable HCV-RNA within 12 weeks of therapy) to PEG-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C [26].

This study aimed to define the pre-treatment prediction of response to PEG-IFN/RBV therapy through the integrated analysis of host factors, such as the *IL28B* genetic polymorphism and various clinical covariates, as well as viral factors, such as mutations in the HCV core and ISDR and serum HCV-RNA load. In addition,

for the general application of these results in clinical practice, decision models for the pre-treatment prediction of response were determined by data mining analysis.

### Materials and methods

#### Patients

This was a multicentre retrospective study supported by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare. Data were collected from a total of 496 chronic hepatitis C patients who were treated with PEG-IFN alpha and RBV at five hospitals and universities throughout Japan. Of these, 98 patients also were included in the original GWAS analysis [6]. The inclusion criteria in this study were as follows (1) infection by genotype 1b, (2) lack of co-infection with hepatitis B virus or human immunodeficiency virus, (3) lack of other causes of liver disease, such as autoimmune hepatitis, and primary biliary cirrhosis, (4) completion of at least 24 weeks of therapy, (5) adherence of more than 80% to the planned dose of PEG-IFN and RBV for the NVR patients, (6) availability of DNA for the analysis of the genetic polymorphism of *IL28B*, and (7) availability of serum for the determination of mutations in the ISDR and substitutions of Core70 and Core91 of HCV. Patients received PEG-IFN alpha-2a (180 µg) or 2b (1.5 µg/kg) subcutaneously every week and were administered a weight adjusted dose of RBV (600 mg for <60 kg, 800 mg for 60–80 kg, and 1000 mg for >80 kg daily) which is the recommended dosage in Japan. Written informed consent was obtained from each patient and the study protocol conformed to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the institutional ethics review committee. The baseline characteristics are listed in Table 1. For the data mining analysis, 67% of the patients (331 patients) were assigned randomly to the model building group and 33% (165 patients) to the validation group. There were no significant differences in the clinical backgrounds between these two groups.

#### Laboratory and histological tests

Blood samples were obtained before therapy and were analyzed for hematologic tests and for blood chemistry and HCV-RNA. Sequences of ISDR and the core region of HCV were determined by direct sequencing after amplification by reverse-transcription and polymerase chain reaction as reported previously [4,11]. Genetic polymorphism in one tagging SNP located near the *IL28B* gene (rs8099917) was determined by the GWAS or DigITag2 assay [27]. Homozygosity (GG) or heterozygosity (TG) of the minor sequence was defined as having the *IL28B* minor allele, whereas homozygosity for the major sequence (TT) was



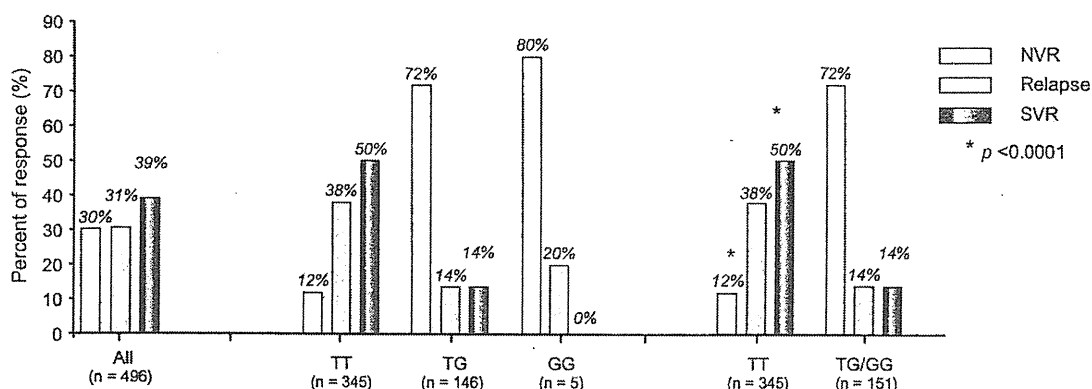


Fig. 1. Association between the *IL28B* genotype (rs8099917) and treatment response. The rates of response to treatment are shown for each rs8099917 genotype. The rate of null virological response (NVR), relapse, and sustained virological response (SVR) is shown. The *p* values are from Fisher's exact test. The rate of NVR was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) and the rate of SVR was significantly lower ( $p < 0.0001$ ) in patients with the *IL28B* minor allele compared to those with the major allele.

defined as having the *IL28B* major allele. In this study, NVR was defined as a less than 2 log reduction of HCV-RNA at week 12 and detectable HCV-RNA by qualitative PCR with a lower detection limit of 50 IU/ml (Amplicor, Roche Diagnostic systems, CA) at week 24 during therapy. RVR (rapid virological response) and complete early virological response (cEVR) were defined as undetectable HCV-RNA at 4 weeks and 12 weeks during therapy and SVR was defined as undetectable HCV-RNA 24 weeks after the completion of therapy. Relapse was defined as reappearance of HCV-RNA after the completion of therapy. The stage of liver fibrosis was scored according to the METAVIR scoring system: 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). Percentage of steatosis was quantified in 111 patients by determining the average proportion of hepatocytes affected by steatosis.

Statistical analysis

Associations between pre-treatment variables and treatment response were analyzed by univariate and multivariate logistic regression analysis. Associations between the *IL28B* polymorphism and sequences of HCV were analyzed by Fisher's exact test. SPSS software v.15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for these analyses. For the data mining analysis, IBM-SPSS Modeler version 13.0 (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL) software was utilized as reported previously [26]. The patients used for model building were divided into two groups at each step of the analysis based on split variables. Each value of each variable was considered as a potential split. The optimum variables and cut-off values were determined by a statistical search algorithm to generate the most significant division into two prognostic subgroups that were as homogeneous as possible for the probability of SVR. Thereafter, each subgroup was evaluated again and divided further into subgroups. This procedure was repeated until no additional significant variable was detected or the sample size was below 15. To avoid over-fitting, 10-fold cross validation was used in the tree building process. The reproducibility of the resulting model was tested with the data from the validation patients.

Results

Association between the *IL28B* (rs8099917) genotype and the PEG-IFN/RBV response

The rs8099917 allele frequency was 70% for TT ( $n = 345$ ), 29% for TG ( $n = 146$ ), and 1% for GG ( $n = 5$ ). We defined the *IL28B* major allele as homozygous for the major sequence (TT) and the *IL28B* minor allele as homozygous (GG) or heterozygous (TG) for the minor sequence. The rate of NVR was significantly higher (72% vs. 12%,  $p < 0.0001$ ) and the rate of SVR was significantly lower (14% vs. 50%,  $p < 0.0001$ ) in patients with the *IL28B* minor allele compared to those with the major allele (Fig. 1).

Effect of the *IL28B* polymorphism, substitutions in the ISDR, Core70, and Core91 of HCV on time-dependent clearance of HCV

Patients were stratified according to their *IL28B* allele type, the number of mutations in the ISDR, the amino acid substitutions in Core70 and Core91, and the rate of undetectable HCV-RNA at 4, 8, 12, 24, and 48 weeks after the start of therapy were analyzed (Fig. 2A–D). The rate of undetectable HCV-RNA was significantly higher in patients with the *IL28B* major allele than the minor allele, in patients with two or more mutations in the ISDR compared to none or only one mutation, in patients with arginine (Arg) at Core70 rather than Gln/His, and in patients with leucine (Leu) at Core91 rather than Met. The difference was most significant when stratified by the *IL28B* allele type. The rate of RVR and cEVR was significantly more frequent in patients with the *IL28B* major allele compared with those with the *IL28B* minor allele: 9% vs. 3% for RVR ( $p < 0.005$ ) and 57% vs. 11% for cEVR ( $p < 0.0001$ ). These findings suggest that *IL28B* has the greatest impact on early virological response to therapy.

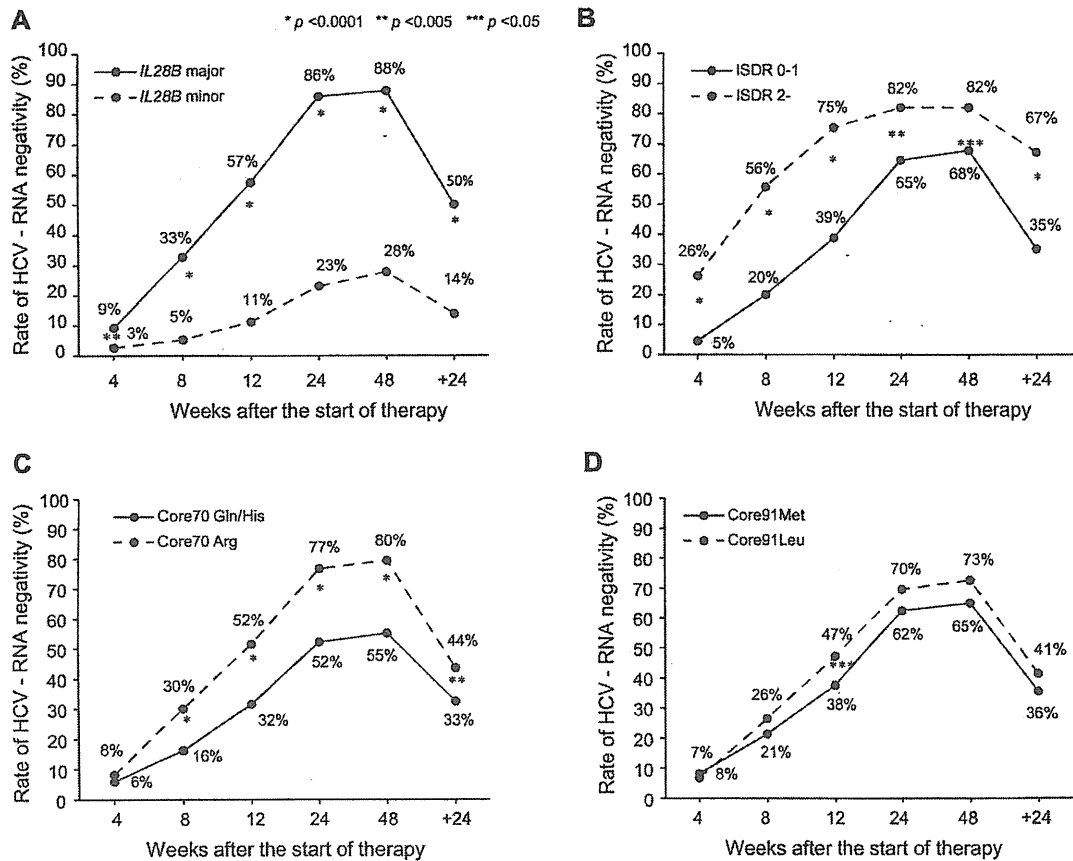
Association between substitutions in the ISDR and relapse after the completion of therapy

Patients were stratified according to the *IL28B* allele, number of mutations in the ISDR, and amino acid substitutions of Core70 and Core91, and the rate of relapse was analyzed (Fig. 3A and B). Among patients who achieved cEVR, the rate of relapse was significantly lower in patients with two or more mutations in the ISDR compared to those with only one or no mutations (15% vs. 31%,  $p < 0.005$ ) (Fig. 3 B). On the other hand, the relapse rate was not different between the *IL28B* major and minor alleles within patients who achieved RVR (3% vs. 0%) or cEVR (28% vs. 29%) (Fig. 3A). Amino acid substitutions of Core70 and Core91 were not associated with the rate of relapse (data not shown).

Factors associated with response by multivariate logistic regression analysis

By univariate analysis, the minor allele of *IL28B* ( $p < 0.0001$ ), one or no mutations in the ISDR ( $p = 0.03$ ), high serum level of

## Research Article



**Fig. 2.** Effect of *IL28B* mutations in the ISDR, Core70, and Core91 of HCV on time-dependent clearance of HCV. The rate of undetectable HCV-RNA was plotted for serial time points after the start of therapy (4, 8, 12, 24, and 48 weeks) and for 24 weeks after the completion of therapy. Patients were stratified according to (A) the *IL28B* allele (minor allele vs. major allele), (B) the number of mutations in the ISDR (0-1 mutation vs. 2 or more mutations), amino acid substitutions of (C) Core70 (Gln/His vs. Arg), and (D) Core91 (Met vs. Leu). The *p* values are from Fisher's exact test.

HCV-RNA ( $p = 0.035$ ), Gln or His at Core70 ( $p < 0.0001$ ), low platelet counts ( $p = 0.009$ ), and advanced fibrosis ( $p = 0.0002$ ) were associated with NVR. By multivariate analysis, the minor allele of *IL28B* (OR = 20.83, 95%CI = 11.63–37.04,  $p < 0.0001$ ) was associated with NVR independent of other covariates (Table 2). Notably, mutations in the ISDR ( $p = 0.707$ ) and at amino acid Core70 ( $p = 0.207$ ) were not significant in multivariate analysis due to the positive correlation with the *IL28B* polymorphism ( $p = 0.004$  for ISDR and  $p < 0.0001$  for Core70, Fig. 4).

Genetic polymorphism of *IL28B* also was associated with SVR (OR = 7.41, 95% CI = 4.05–13.57,  $p < 0.0001$ ) independent of other covariates, such as platelet counts, fibrosis, and serum levels of HCV-RNA. Mutation in the ISDR was an independent predictor of SVR (OR = 2.11, 95% CI = 1.06–4.18,  $p = 0.033$ ) but the amino acid at Core70 was not (Table 3).

### Factors associated with the *IL28B* polymorphism

Patients with the *IL28B* minor allele had significantly higher serum level of gamma-glutamyltransferase (GGT) and a higher

frequency of hepatic steatosis (Table 4). When the association between the *IL28B* polymorphism and HCV sequences was analyzed, Gln or His at Core70, that is linked to resistance to PEG-IFN and RBV therapy [4,14,15], was significantly more frequent in patients with the minor *IL28B* allele than in those with the major allele (67% vs. 30%,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 4). Other HCV sequences with an IFN resistant phenotype also were more prevalent in patients with the minor *IL28B* allele than those with the major allele: Met at Core91 (46% vs. 37%,  $p = 0.047$ ) and one or no mutations in the ISDR (94% vs. 85%,  $p = 0.004$ ) (Fig. 4).

### Data mining analysis

Data mining analysis was performed to build a model for the prediction of SVR and the result is shown in Fig. 5. The analysis selected four predictive variables, resulting in six subgroups of patients. Genetic polymorphism of *IL28B* was selected as the best predictor of SVR. Patients with the minor *IL28B* allele had a lower probability of SVR and a higher probability of NVR than those with the major *IL28B* allele (SVR: 14% vs. 50%, NVR: 72% vs.

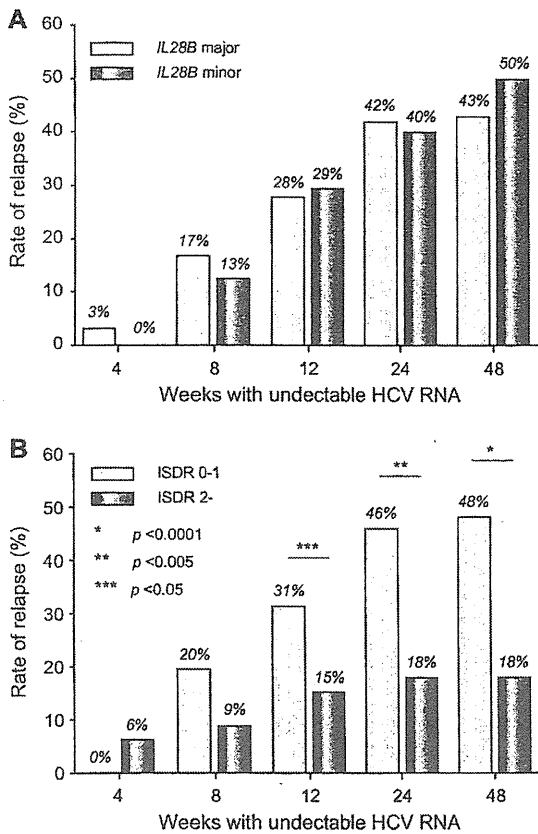


Fig. 3. Association between relapse and the *IL28B* allele or mutations in the ISDR. The rate of relapse was calculated for patients who had undetectable HCV-RNA at serial time points after the start of therapy (4, 8, 12, 24, and 48 weeks). Patients were stratified according to (A) the *IL28B* allele (minor allele vs. major allele) and (B) the number of mutations in the ISDR (0–1 mutation vs. 2 or more mutations). The *p* values are from Fisher's exact test.

12%). After stratification by the *IL28B* allele, patients with low platelet counts ( $<140 \times 10^9/L$ ) had a lower probability of SVR and higher probability of NVR than those with high platelet counts ( $\geq 140 \times 10^9/L$ ): for the minor *IL28B* allele, SVR was 7% vs. 19%, and NVR was 84% vs. 62%, and for the major *IL28B* allele, SVR was 32% vs. 66% and NVR was 16% vs. 8%. Among patients with the major *IL28B* allele and low platelet counts, those with two or more mutations in the ISDR had a higher probability of SVR and lower probability of relapse than those with one or no mutations in the ISDR (SVR: 75% vs. 27%, and relapse: 8% vs. 57%). Among patients with the major *IL28B* allele and high platelet counts, those with a low HCV-RNA titer ( $<600,000$  IU/ml) had a higher probability of SVR and lower probability of NVR and relapse than those with a high HCV-RNA titer (SVR: 90% vs. 61%, NVR: 0% vs. 10%, and relapse: 10% vs. 29%). The sensitivity and specificity of the decision tree were 78% and 70%, respectively. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve of the model was 0.782 (data not shown). The pre-

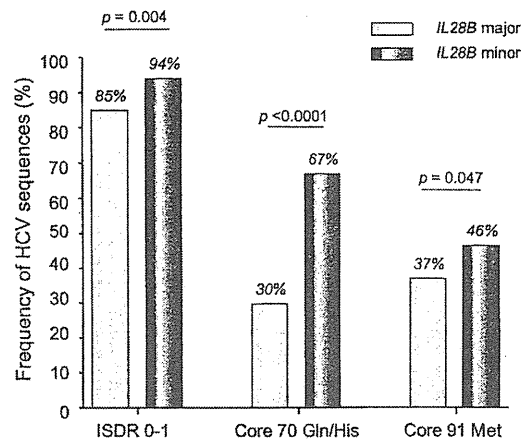


Fig. 4. Associations between the *IL28B* allele and HCV sequences. The prevalence of HCV sequences predicting a resistant phenotype to IFN was higher in patients with the minor *IL28B* allele than those with major allele. (A) 0 or 1 mutation in the ISDR of NS5A, (B) Gln or His at Core70, and (C) Met at Core91. *p* values are from Fisher's exact test.

portion of patients with advanced fibrosis (F3-4) was 39% (84/217) in patients with low platelet counts ( $<140 \times 10^9/L$ ) compared to 13% (37/279) in those with high platelet counts ( $\geq 140 \times 10^9/L$ ).

Validation of the data mining analysis

The results of the data mining analysis were validated with 165 patients who differed from those used for model building. Each patient was allocated to one of the six subgroups for the validation using the flow-chart form of the decision tree. The rate of SVR and NVR in each subgroup was calculated. The rates of SVR and NVR for each subgroup of patients were closely correlated between the model building and the validation patients ( $r^2 = 0.99$  and  $0.98$ ) (Fig. 6).

Discussion

The rate of NVR after 48 weeks of PEG-IFN/RBV therapy among patients infected with HCV of genotype 1 is around 20–30%. Previously, there have been no reliable baseline predictors of NVR or SVR. Because more potent therapies, such as protease and polymerase inhibitor of HCV [28,29] and nitazoxanide [30], are in clinical trials and may become available in the near future, a pre-treatment prediction of the likelihood of response may be helpful for patients and physicians, to support clinical decisions about whether to begin the current standard of care or whether to wait for emerging therapies. This study revealed that the *IL28B* polymorphism was the overwhelming predictor of NVR and is independent of host factors and viral sequences reported previously. The *IL28B* encodes a protein also known as IFN-lambda 3, which is thought to suppress the replication of various viruses including HCV [31,32]. The results of the current study and the findings of the GWAS studies [6–9] may provide the rationale for developing diagnostic testing or an IFN-lambda based therapy for chronic hepatitis C in the future.

## Research Article

Table 2. Factors associated with NVR analyzed by univariate and multivariate logistic regression analysis.

	Univariate			Multivariate		
	Odds ratio	95%CI	p value	Odds ratio	95%CI	p value
Gender: female	0.98	0.67-1.45	0.938	1.29	0.75-2.23	0.363
Age	1.01	0.97-1.01	0.223	0.99	0.97-1.02	0.679
ALT	1.00	1.00-1.00	0.867	1.00	0.99-1.00	0.580
GGT	1.004	1.00-1.01	0.029	1.00	1.00-1.00	0.715
Platelets	0.95	0.91-0.99	0.009	0.92	0.87-0.98	0.006
Fibrosis: F3-4	2.23	1.46-3.42	0.0002	1.97	1.09-3.57	0.025
HCV-RNA: $\geq 600,000$ IU/ml	1.83	1.05-3.19	0.035	2.49	1.17-5.29	0.018
ISDR mutation: $\leq 1$	2.14	1.08-4.22	0.030	0.96	0.78-1.18	0.707
Core 70 (Gln/His)	3.23	2.16-4.78	<0.0001	1.41	0.83-2.42	0.207
Core 91 (Met)	1.39	0.95-2.06	0.093	1.21	0.72-2.04	0.462
IL28B: Minor allele	19.24	11.87-31.18	<0.0001	20.83	11.63-37.04	<0.0001

ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyltransferase; ISDR, interferon sensitivity determining region; Gln, glutamine; His, histidine; Met, methionine; Minor allele, heterozygote or homozygote of minor allele.

Table 3. Factors associated with SVR analyzed by univariate and multivariate logistic regression analysis.

	Univariate			Multivariate		
	Odds ratio	95%CI	p value	Odds ratio	95%CI	p value
Gender: female	0.81	0.56-1.16	0.253	0.86	0.55-1.35	0.508
Age	0.97	0.95-0.99	0.0003	0.99	0.96-1.01	0.199
ALT	1.00	1.00-1.00	0.337	1.00	1.00-1.01	0.108
GGT	1.00	1.00-1.00	0.273	1.00	1.00-1.00	0.797
Platelets	1.12	1.01-1.16	<0.0001	1.13	1.08-1.19	<0.0001
Fibrosis: F0-2	2.64	1.65-4.22	<0.0001	1.87	1.07-3.28	0.029
HCV-RNA: <600,000 IU/ml	2.49	1.55-3.98	0.0001	2.75	1.55-4.90	0.001
ISDR mutation: $\leq 2$	3.78	2.14-6.68	<0.0001	2.11	1.06-4.18	0.033
Core 70 (Arg)	1.61	1.11-2.28	0.012	0.84	0.52-1.35	0.470
Core 91 (Leu)	1.28	0.88-1.85	0.185	1.26	0.81-1.96	0.300
IL28B: Major allele	6.21	3.75-10.31	<0.0001	7.41	4.05-13.57	<0.0001

ALT, alanine aminotransferase; GGT, Gamma-glutamyltransferase; ISDR, interferon sensitivity determining region; Arg, arginine; Leu, leucine; Major allele, homozygote of major allele.

Among baseline factors, *IL28B* was the most significant predictor of NVR and SVR. Moreover, the *IL28B* allele type was also correlated with early virological response: the rate of RVR and cEVR was significantly high for the *IL28B* major allele compared to the *IL28B* minor allele: 9% vs. 3% for RVR and 57% vs. 11% for cEVR (Fig. 2). On the other hand, the relapse rate was not different between the *IL28B* genotypes within patients who achieved RVR or cEVR (Fig. 3). We believe that optimal therapy should be based on baseline features and a response-guided approach. Our findings suggest that the *IL28B* genotype is a useful baseline predictor of virological response which should be used for selecting the treatment regimen: whether to treat patients with PEG-IFN and RBV or to wait for more effective future therapy including direct acting antiviral drugs. On the other hand, baseline *IL28B* genotype might not be suitable for determining the treatment duration in patients who started PEG-IFN/RBV therapy

and whose virological response is determined because the *IL28B* genotype is not useful for the prediction of relapse. The duration of therapy should be personalized based on the virological response. Future studies need to explore whether the combination of baseline *IL28B* genotype and response-guided approach further improves the optimization of treatment duration.

The SVR rate in patients having the *IL28B* minor allele was 14% in the present study while it was 23% in Caucasians and 9% in African Americans in a study by McCarthy et al. [33]. On the other hand, the SVR rate in patients having the *IL28B* minor allele was 28% in genotypes 1/4 compared to 80% in genotypes 2/3 in a study by Rauch et al. [9]. These data imply that the impact of the *IL28B* polymorphism on response to therapy may be different in terms of race, geographical areas, or HCV genotypes, and that our data need to be validated in future studies including different populations and geographical areas before generalization.