

図6 核酸アナログ中止時のHBV RNA+DNA/DNA比およびHBV DNA+RNA値を用いた累積再燃率の比較

治療中止時のHBV RNA+DNA/DNA比が0.4未満かつHBV DNA+RNA値が4.0Log copies/ml未満の症例では、その他の症例に比べ、有意にHBV DNAの累積再上昇率は低く、24週後の累積再上昇率は有意に低かった(Log rank test)。

表3 核酸アナログ中止後24週以内のALT再上昇に関与する因子の検討

	再上昇あり (N=15)	再上昇なし (N=21)	P value
性別(男:女)	8 : 7	15 : 6	0.310*
HBV genotype(B : C : ND)	0 : 14 : 1	1 : 19 : 1	1.000*
年齢(歳)	40(25~59)	46(22~66)	0.446**
治療中止時			
血小板数($\times 10^4/\mu\text{l}$)	15.9(8.9~28.7)	13.7(7.1~20.6)	0.298**
T. Bil(mg/dl)	0.8(0.3~1.3)	0.6(0.4~1.1)	0.312**
AST(IU/l)	24(16~42)	26(19~49)	0.559**
ALT(IU/l)	31(12~54)	23(11~67)	0.804**
HBe抗原(+ : -)	8 : 7	3 : 18	0.020*
HBs抗原量(IU/ml)	3,521(481~11,607)	1,054(0.5~20,488)	0.161**
HBコア関連抗原量(LogU/ml)	5.4(3.6~8.2)	4.4(3.0~6.6)	0.099**
HBV DNA(Log copies/ml)	4.0(2.1~9.2)	3.3(1.8~6.1)	0.440**
HBV DNA+RNA(Log copies/ml)	4.4(3.1~8.7)	3.5(2.3~5.7)	0.017**
HBV RNA+DNA/HBV DNA比	0.8(-1.0~2.8)	-0.1(-1.6~1.4)	0.100**
Sequential therapyの併用(+ : -)	11 : 4	16 : 5	1.000*
治療期間(weeks)	29(24~221)	31(19~304)	0.568**

* Chi-square test or Fisher's test, ** Mann-Whitney U test

た21症例(ALT非上昇軍)に群別し、治療前の臨床背景を検討した(表3)。その結果、DNA再上昇を検討した際に抽出された治療中止時のHBV DNA+RNA量やHBV RNA+DNA/HBV DNA比は、

ALT再上昇との相関は認められなかった。その一方で、治療中止時のHBe抗原の有無とHBV DNA+RNA量への相関が認められた。そこで、治療中止時のHBe抗原の有無とHBV DNA+RNA量を

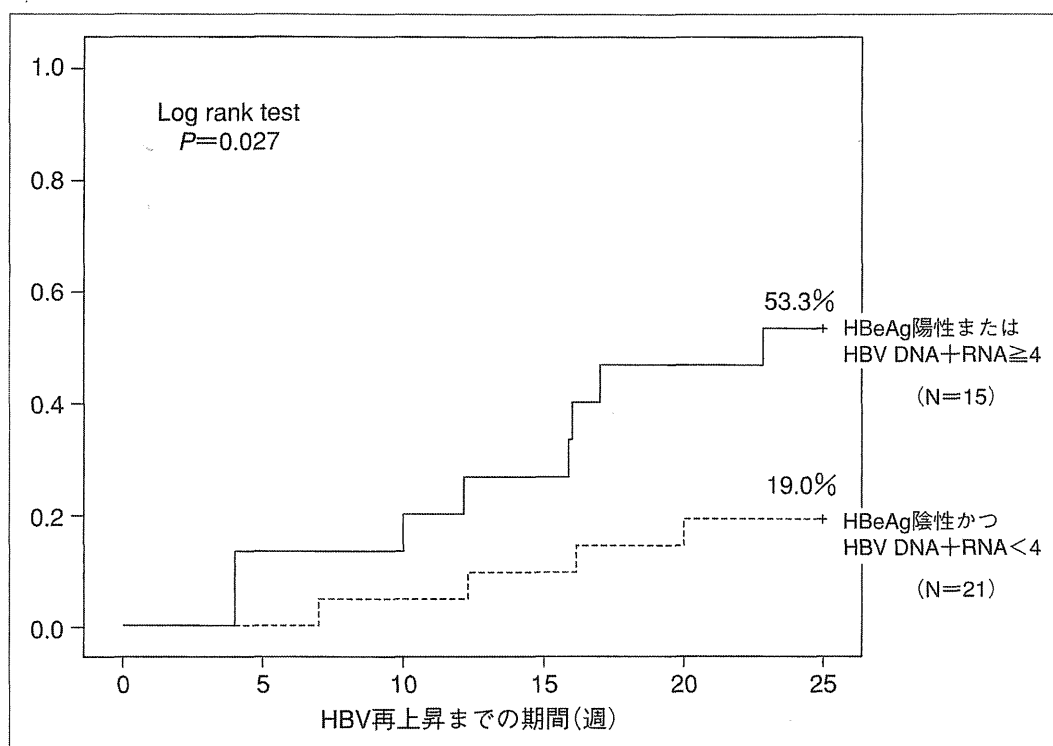


図7 核酸アナログ中止時のHBV RNA+DNA/DNA比およびHBV DNA+RNA値を用いた累積再燃率の比較

治療中止時のHBV DNA+RNA値が4.0 Log copies/ml未満かつHBe抗原陰性の症例では、その他の症例に比べ、有意にALTの累積再上昇率は低く、24週後の累積再上昇率は有意に低かった(Log rank test)。

用いて、HBV DNAの累積再上昇率を検討したところ、中止時にHBe抗原陰性かつHBV DNA+RNA量が4 Logcopies/ml未満であった群(N=21)では、その他の症例(N=15)よりもALT累積再上昇率は有意に低く、中止後24週での再上昇率は19.0%と低率であった(図7, $P=0.027$)。

考 察

核酸アナログ療法では、治療早期より血清HBV DNAは減少し、ほとんどの症例で、検出できないレベルまでウイルス量は低下する^{13)~16)}。しかしながら、本治療法はウイルスの増殖を抑制し、肝炎の沈静を図ることが目的であり、ウイルスを完全に排除することはきわめて困難であり、治療を中止すると、きわめて高い確率でHBV DNAが再上昇し、肝炎を再燃する(図2)。本研究では、核酸アナログ治療の中止をより安全に行うためのマーカーを探索することを目的として検討を行った。治療中止後のHBV DNA再上昇に関与する因子としては、治療前のALT値、HBV DNA

量および治療中止時のHBV RNA+DNA量、HBV RNA+DNA/DNA比が抽出され、ALT再上昇に関与する因子としては、治療前のHBeAgの有無と治療中止時のHBV RNA+DNA/DNA比が抽出された。結果的には、HBV DNA、ALTいずれの再上昇に関しても、ウイルス側の要因としてHBV RNA+DNA/DNA比が抽出されたことになる。HBV RNAは、細胞内で複製されたpregenome RNAが核酸アナログ治療により逆転写反応が行われず、そのままHBs蛋白に被われ、細胞外に放出されたものと考えられ、HBV DNA+RNA量とHBV DNA量の間乖離が認められるのは、感染HBVの複製能力が高いことを意味しているものと考えられる。つまり、感染HBVの複製能力が高い場合、核酸アナログ療法中には、コア蛋白に被われたpregenome RNAのままの粒子が細胞内に蓄積し、一部は逆転写反応が行われなまま、細胞内に放出されるために、HBV DNA+RNA量とHBV DNA量の間乖離が生じる。一方、感染HBVの複製能力が低い場合には、コア蛋白に

被われたpregenome RNAのままの粒子の細胞内への蓄積はわずかであり、ほとんどのウイルス粒子は逆転写反応が行われたのちに、細胞内に放出されるために、HBV DNA+RNA量とHBV DNA量がほぼ同等となるものと推定される。そのため、感染HBVの複製能力が高い場合には、中止後早期にHBV DNAが増加し、肝炎再燃に至ったものと考えられる。しかしながら、本研究は対象症例が36例と少数であったことから、HBV RNA+DNA/DNA比をHBV DNAやALTの再上昇に関与する独立因子として抽出するには至っておらず、症例を追加した上での検討が重要と考えられる。また、HBV DNAは、臨床の現場で測定可能であるが、HBV RNAの定量は臨床現場での測定は困難であり、また、測定方法も煩雑であるから、今後の臨床応用に向けたさらなる検討が必要と考えられる。

おわりに

現在、B型慢性肝炎患に対する治療の標準化に関するガイドラインでは、特に35歳未満の若年症例を対象として、drug freeを目指したIFN単独療法やsequential therapyが推奨されており、2011年度のガイドラインでは、sequential therapyの開始時期などについても提示されている。本研究では、安全な核酸アナログ療法での中止を目指す上で、HBV DNA+RNA量が有用なマーカーとなりうる可能性を示したが、決して十分条件とは言えない。現在、各種HBV関連マーカーを中心とした中止基準の作成が試みられているが、安全かつ確実な核酸アナログ療法の中止を判断できるマーカーは見つかっておらず、今後の検討課題である。

文 献

- 1) Kumada H, Okanoue T, Onji M, et al. Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis B virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepatol Res* 2010 ; 40 : 1.
- 2) Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007 ; 132 : 1574.
- 3) Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV : standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007 ; 46 : 254.
- 4) Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 ; 48 : 3498.
- 5) Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al. Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 ; 51 : 902.
- 6) Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, et al. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol* 2007 ; 79 : 1811.
- 7) Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, et al. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy : two-year follow-up. *J Hepatol* 2008 ; 48 : 923.
- 8) Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 1593.
- 9) Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, et al. Correlation of YMDD mutation and breakthrough hepatitis with hepatitis B virus DNA and serum ALT during lamivudine treatment. *Hepatol Res* 2010 ; 40 : 125.
- 10) Huang YW, Chayama K, Tsuge M, et al. Differential effects of interferon and lamivudine on serum HBV RNA inhibition in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2010 ; 15 : 177.
- 11) Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, et al. Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2007 ; 45 : 1179.
- 12) Pugh JC, Bassendine MF. Molecular biology of hepadnavirus replication. *Br Med Bull* 1990 ; 46 : 329.
- 13) Chang TT, Gish RG, de Man R, et al. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006 ; 354 : 1001.

- 14) Lai CL, Chien RN, Leung NW, et al. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. N Engl J Med 1998 ; 339 : 61.
- 15) Lai CL, Rosmawati M, Lao J, et al. Entecavir is superior to lamivudine in reducing hepatitis B virus

DNA in patients with chronic hepatitis B infection. Gastroenterology 2002 ; 123 : 1831.

- 16) Lai CL, Shouval D, Lok AS, et al. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. N Engl J Med 2006 ; 354 : 1011.

* * *

Medical Practice

2011 vol. 28 no. 8

ヒト肝細胞キメラマウスを用いたB型肝炎ウイルス感染と
それに伴うヒト肝細胞内遺伝子の発現変化
柘植雅貴・平賀伸彦・茶山一彰

東京 文光堂 本郷

ヒト肝細胞キメラマウスを用いたB型肝炎ウイルス感染とそれに伴うヒト肝細胞内遺伝子の発現変化

柘植雅貴・平賀伸彦・茶山一彰

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学/つげ・まさたか ひらが・のぶひこ ちゃやま・かずあき

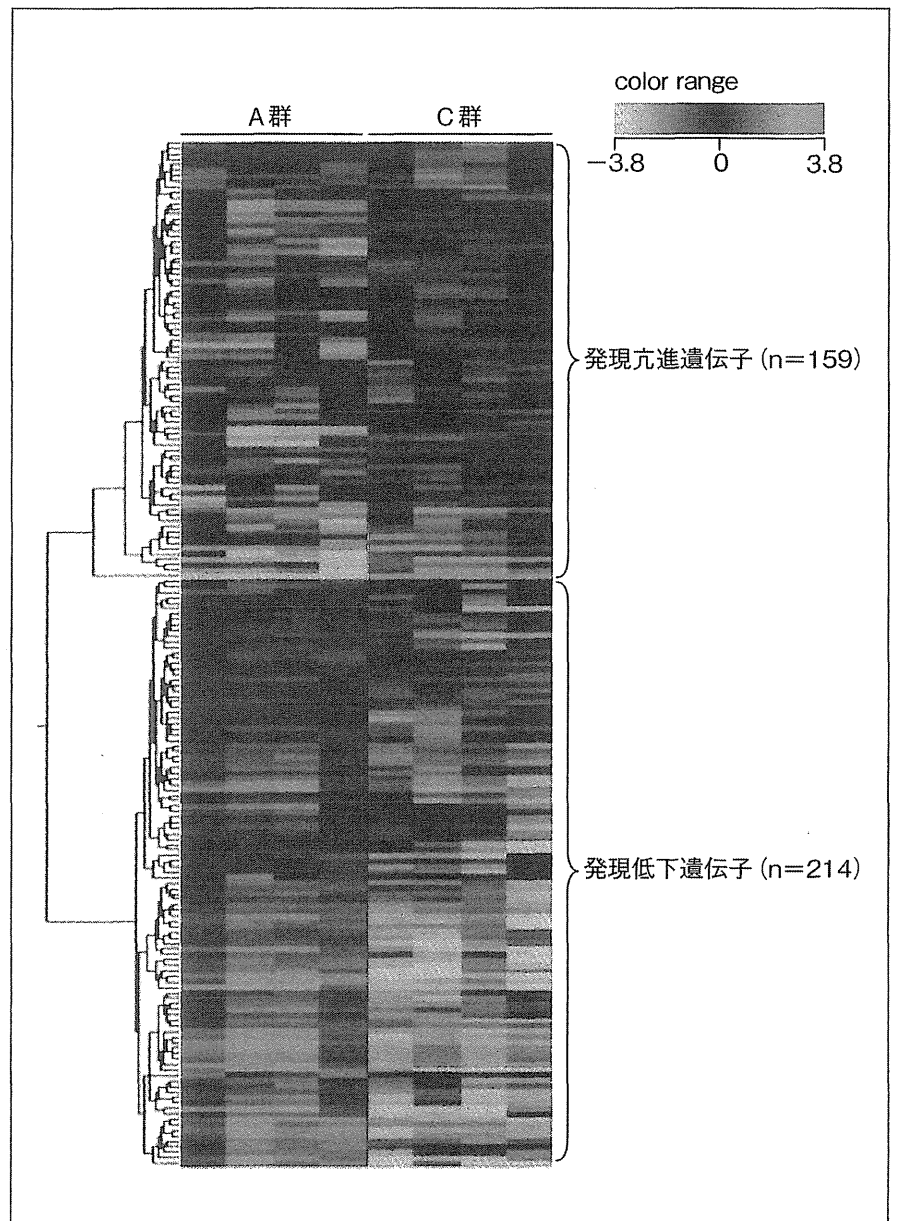
はじめに●

B型肝炎ウイルス hepatitis B virus (HBV) や C型肝炎ウイルス hepatitis C virus (HCV) は、種選択性が高く、ヒトのほか、チンパンジー、ツパイといった限られた動物にのみ感染する。これまでチンパンジーを用いた研究が試みられてきたが、ワシントン条約による厳格な制限と高額な飼育費

用、限定された飼育施設の必要性から、肝炎ウイルス感染・複製メカニズムの研究は困難であった。2001年、Mercerらにより、マウス肝臓内にヒト肝細胞を有するヒト肝細胞キメラマウスが作製され、HCVがこのマウスに感染することが示された¹⁾。その後、当研究室も当大学の理学部との共同研究により、SCIDマウス由来のヒト肝細

図1 HBV感染に伴うヒト肝細胞内遺伝子発現の変化

HBV感染に伴い、373遺伝子に3倍以上の発現変化が観察された。



- マウス肝臓がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが開発された。
- ヒト肝細胞キメラマウスには、HBV や HCV の感染が可能である。
- キメラマウス肝から採取したヒト肝細胞でマイクロアレイ解析を行った。
- HBV 感染に伴い、発癌遺伝子の活性化だけでなく、転写調節や DNA 修復が傷害されている可能性がある。

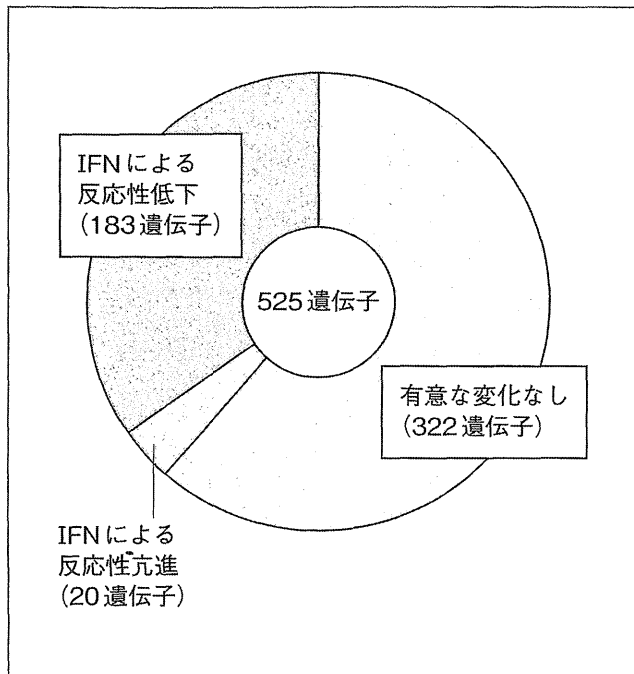


図2 HBV 非感染時に IFN 投与にて発現が亢進した 525 遺伝子の HBV 感染時における IFN 応答
 HBV 非感染時に、IFN が接種された場合、525 遺伝子の発現が誘導されたが、HBV 感染に伴い、その 34.9% は、IFN による誘導が低下した。

胞キメラマウスを作製し²⁾、HBV や HCV が持続感染すること、インターフェロン(IFN)などの薬効評価に有用であることを示してきた^{3, 4)}。本稿では、このヒト肝細胞キメラマウスを用いた HBV 感染や IFN 投与が及ぼすヒト肝細胞内の遺伝子発現への影響に関する研究を紹介する。

HBV 感染が及ぼすヒト肝細胞内遺伝子発現の 変化●

本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスを HBV 感染や IFN 投与の有無により、4 群(A 群は HBV 非感染/IFN 非投与のコントロール、B 群は HBV 非感染/IFN 投与群、C 群は HBV 感染/IFN 非投与群、D 群は HBV 感染/IFN 投与群)に群別した。各種マウス作製後、マウス肝にあるヒト肝細胞を

採取。採取したヒト肝細胞を用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行った。まず、A 群と C 群、つまり、HBV 感染の有無によるヒト肝細胞内の遺伝子発現変化について検討した。その結果、HBV 感染に伴い 159 遺伝子の発現は亢進し、214 遺伝子の発現は低下した(図 1)。GDF15 や GDNF といった oncogenic な機能を持つ遺伝子の発現亢進や、転写や DNA 修復に関与する遺伝子の発現低下が確認され、HBV 関連発癌には、oncogenic な機能を持つ遺伝子の活性化だけでなく、転写調節や DNA 修復の障害が強く関与している可能性が示唆される⁵⁾。

HBV 感染による肝細胞内の IFN 応答の変化●

以前より、B 型慢性肝炎に対して IFN 治療効果は十分とはいえず、HBV が IFN に対する抵抗性を獲得しているものと考えられている。そこで、A 群と B 群の遺伝子発現の変化(HBV 非感染時の IFN 応答)と C 群と D 群の遺伝子発現の変化(HBV 感染時の IFN 応答)を比較し、HBV が IFN に対する抵抗性を獲得するメカニズムについて検討した。HBV 非感染時に IFN 投与による発現亢進が確認された 525 遺伝子のうち、183 遺伝子(34.9%)は HBV 感染に伴い IFN に対する反応性の低下が観察された(図 2)。特に、この 183 遺伝子には、IFN シグナルやウイルスの認識に関与する遺伝子が多く含まれていた。

おわりに●

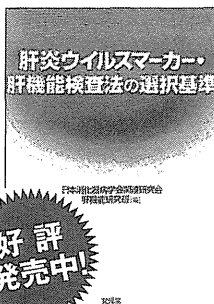
手術や肝生検を用いた肝組織のマイクロアレイ解析では、肝炎に伴いリンパ球をはじめとした免疫細胞浸潤が生じており、肝細胞も免疫応答の影響を強く受けていることが予想される。その結果、肝組織の遺伝子発現変化が直接的な HBV 感染に伴うものか、免疫応答に伴うものかを判断す

- HBV 感染は、ヒト肝細胞の IFN 応答を低下させる。
- ヒト肝細胞キメラマウスは、生体内の免疫に影響を受けない。
- ヒト肝細胞キメラマウスモデルは、免疫の影響を排除した HBV の直接的な肝細胞への影響が観察可能である。

ることは困難である。ヒト肝細胞キメラマウスは、SCID マウス由来であることから、T 細胞、B 細胞系の免疫応答が欠如しており、本研究の結果は、免疫の影響を排除した HBV の直接的な肝細胞への影響を反映するものと考えられる。B 型慢性肝炎の病態は依然として不明な点が多く、分子病態メカニズムの解明に本マウスモデルは有用と考えられる。

文 献

- 1) Mercer, D.F. et al. : Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. Nat Med 7 : 927-933, 2001
- 2) Tateno, C. et al. : Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. Am J Pathol 165 : 901-912, 2004
- 3) Hiraga, N. et al. : Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. FEBS Lett 581 : 1983-1987, 2007
- 4) Tsuge, M. et al. : Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. Hepatology 42 : 1046-1054, 2005
- 5) Tsuge, M. et al. : Effects of HBV infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice. J Infect Dis (in press)



肝炎ウイルスマーカー・肝機能検査法の選択基準

編集●日本消化器病学会関連研究会肝機能研究班

◆肝疾患の発見・診断に現時点で最も望ましいと考えられる、肝炎ウイルスマーカー、肝機能検査法の選択基準を、日本消化器病学会関連研究会消化器科医肝機能研究班での検討に基づきまとめた。実地診療医、消化器科医必携の1冊。

◎B5判・40頁・2色刷／定価1,260円(本体1,200円+税5%) ISBN978-4-8306-1870-3

文光堂

<http://www.bunkodo.co.jp> 〒113-0033 東京都文京区本郷7-2-7 tel.03-3813-5478/fax.03-3813-7241

特集II B型肝炎の抗ウイルス療法の進歩と耐性

HBV RT領域変異株におけるテノホビルの抗ウイルス効果の検討*

柘植 雅貴**
平賀 伸彦**
茶山 一彰**

Key Words : hepatitis B virus (HBV), human hepatocyte chimeric mouse, nucleotide analogue, drug resistant, tenofovir

はじめに

2000年以降, B型慢性肝炎に対する治療薬としてラミブジン(ゼフィックス®, LMV), アデフォビル(ヘプセラ, ADV), エンテカビル(バラクルード®, ETV)といった核酸アナログ製剤が保険適応となり, B型慢性肝炎治療の中心的薬剤となっている。核酸アナログ製剤は, B型肝炎ウイルス(HBV)の増殖過程において, ウイルスポリメラーゼに取り込まれ, chain terminatorとしてマイナス鎖合成時の逆転写反応やプラス鎖合成時の伸長反応を阻害することで, 強力な抗ウイルス効果を発揮する。しかしながら, 強力な抗ウイルス効果の反面, 核酸アナログ治療による感染肝細胞からHBV完全排除はきわめて困難であり, 多くの症例で, 数年に及ぶ核酸アナログ治療が行われているのが現状である。その結果, 一部の症例では, HBVポリメラーゼ遺伝子RT領域のアミノ酸変異が生じ, 薬剤耐性を獲得したHBVが増殖することによってviral breakthroughやbreakthrough hepatitisを発症しており, 薬剤耐性HBVに対する治療法の確立が大きな課題となっている^{1)~4)}。

当研究室では, *in vitro*および*in vivo*におけるHBV複製・感染モデルを確立し, ポリメラーゼ領域の変異に伴うHBVに対する各種核酸アナログ製剤の抗ウイルス効果を評価し, 報告してきた²⁾³⁾⁵⁾。本稿では, その*in vitro*および*in vivo*の薬効評価系を用いて, ポリメラーゼ領域の変異株に対するテノホビル(TDF)の抗ウイルス効果を評価したので報告する。

In vitro HBV複製系を用いた薬効評価系の構築

B型慢性肝炎症例に対して核酸アナログ製剤を長期間使用すると, HBVポリメラーゼ遺伝子のRT領域で生じたアミノ酸変異に伴い, HBVは薬剤耐性を獲得する。特にRT領域にあるYMDD motif(RT領域203~206番アミノ酸)のメチオニン(M)がバリン(V)やイソロイシン(I)へと変異すると, 高度なLMV耐性を獲得する⁶⁾⁷⁾。そこで, さまざまな薬剤耐性変異について解析するため, HBV感染患者の血清からHBVゲノムを抽出し, 1.4倍長のHBVゲノムをベクターに挿入したHBV発現プラスミド(野生株)を作製した。さらに, これらのプラスミドのRT領域にHBVの薬剤耐性変異を加え, 薬剤耐性HBV発現プラスミドを作製した。作製したHBVクローンは, 図1に示すように, 野生株に加え, LMV耐性変異であるrtL180M/rtM204V変異を加えたrtL180M/rtM204V株, LMV/ADV耐性

* Anti-viral effects of tenofovir for HBV mutants.

** Masataka TSUGE, M.D., Ph.D., Nobuhiko HIRAGA, M.D., Ph.D. & Kazuaki CHAYAMA, M.D., Ph.D.: 広島大学病院消化器・代謝内科(☎734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3); Department of Medicine and Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima 734-8551, JAPAN

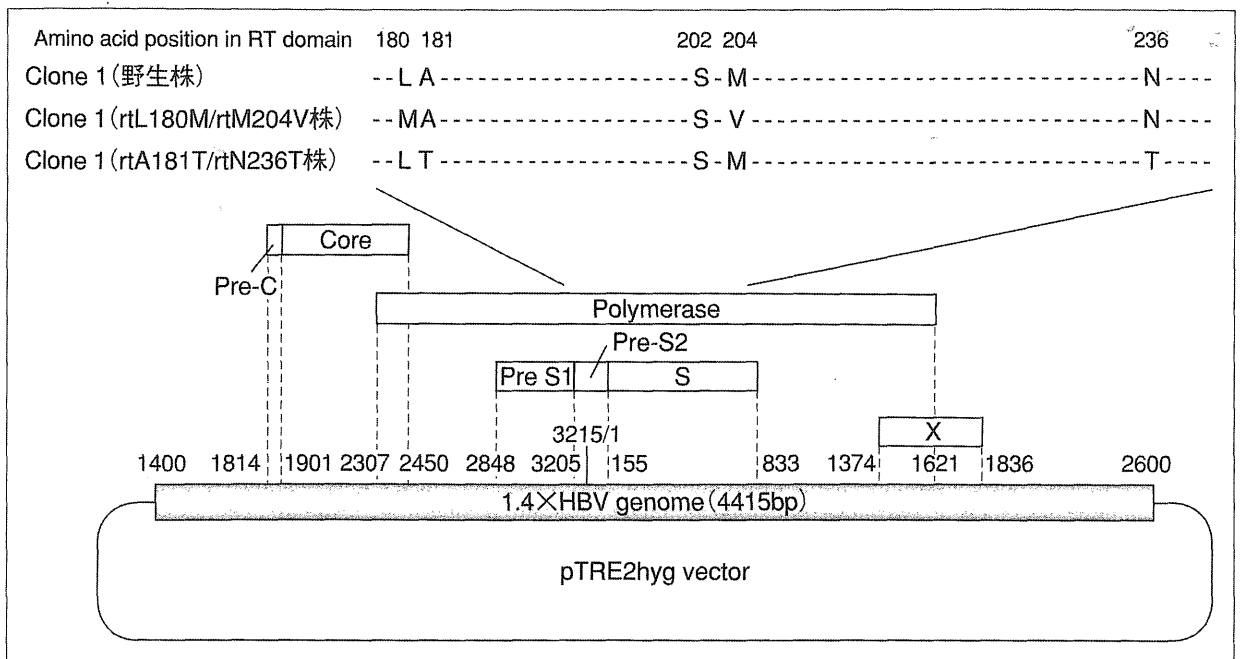


図1 本検討に使用したHBV発現プラスミドの構造と薬剤耐性変異導入部位

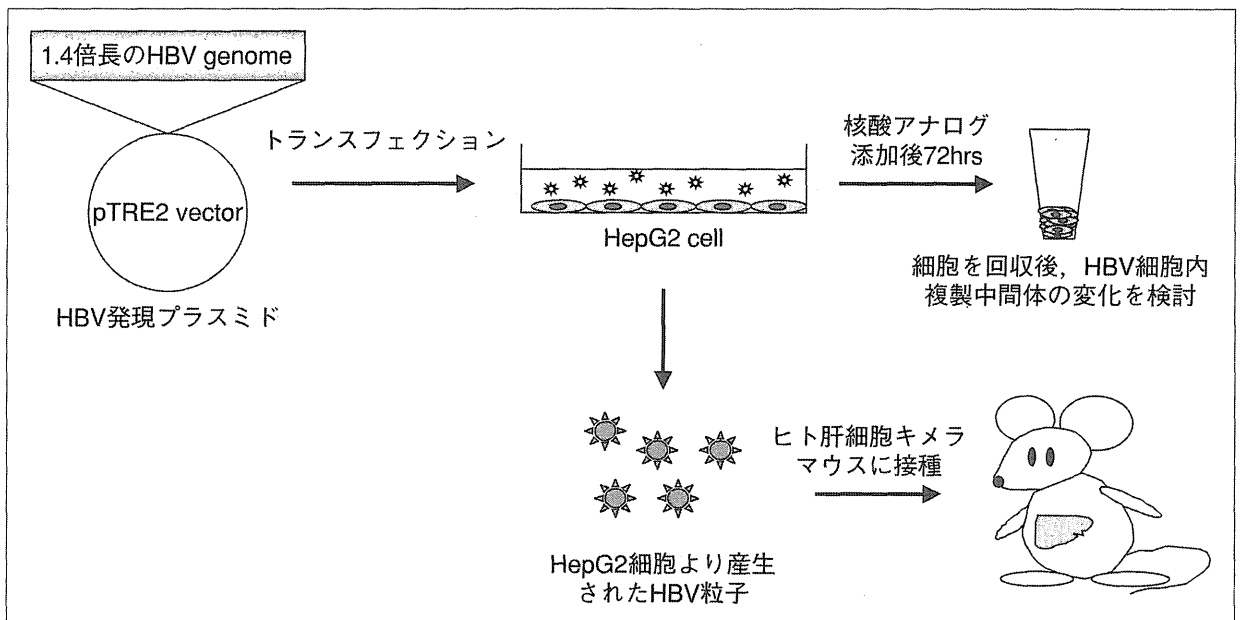


図2 本研究の流れ

HBV感染患者血清をもとに作製したHBV発現プラスミドをHepG2細胞にトランスフェクション。24時間後より、培養上清中に核酸アナログを添加し、72時間後に細胞を回収。細胞内のHBV複製中間体を定量し、抗ウイルス効果を検討 (*in vitro*)。また、HBV発現プラスミドをトランスフェクションしたHepG2細胞から産生されたHBV粒子を回収し、ヒト肝細胞キメラマウスの尾静脈より接種。HBV感染が成立後、マウスに核酸アナログを経口投与し、マウス血清中のHBV DNAの変化を解析し、核酸アナログの抗ウイルス効果を検討 (*in vivo*)。

rtA181T/rtN236T変異を加えたrtA181T/rtN236T株の3種類である。これらのプラスミドをHepG2細胞にトランスフェクションし、その後、培養上清中に核酸アナログを添加。72時間後に細胞を回収し、細胞内複製中間体量を測定することによっ

て、*in vitro*でのHBVクローンの核酸アナログの感受性を評価した(図2)。

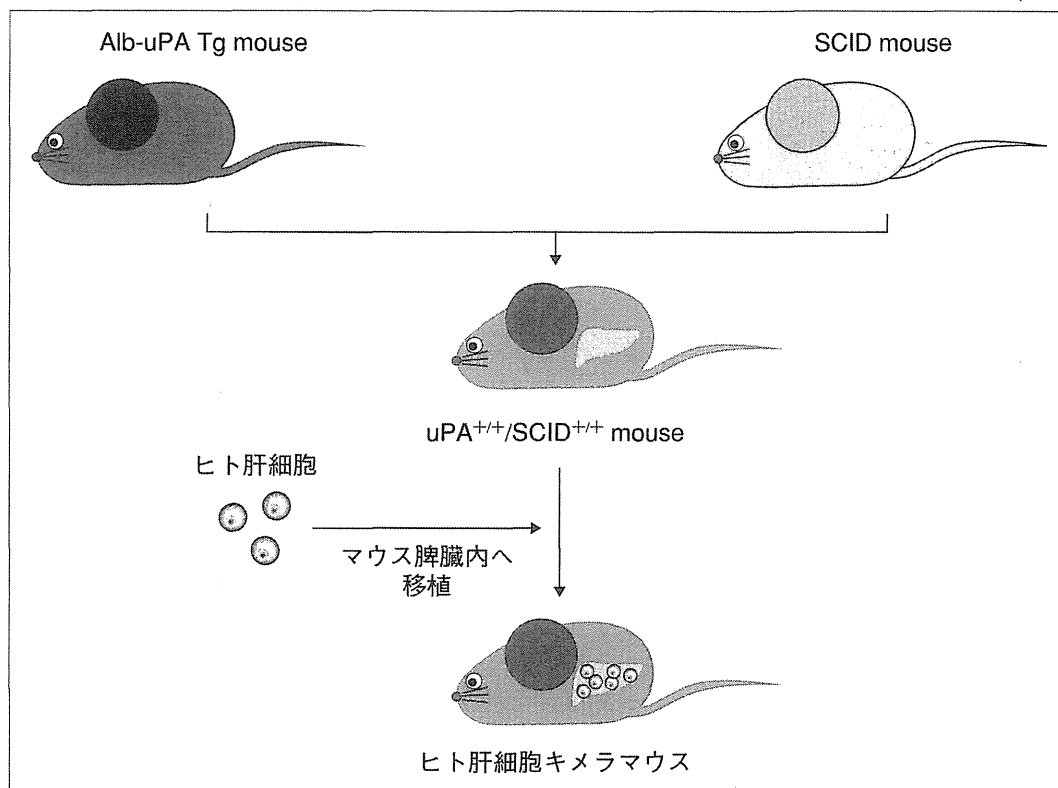


図3 ヒト肝細胞キメラマウスの構築

Alb-uPAトランスジェニックマウスとSCIDマウスを交配させ、uPA^{+/+}/SCID^{+/+}マウスを作製。同マウスに対し、経脾的にヒト肝細胞を移植。ヒト肝細胞は、マウス肝臓内で生着し、ヒト肝細胞キメラマウスが作製される。(文献¹⁰⁾より引用改変)

In vivo HBV感染・複製モデルを用いた薬効評価系の構築

HBVは、マウスやラットといった小動物には感染せず、ヒトやチンパンジーといった特定の動物のみに感染する。そのため、*in vivo*におけるHBV研究は、チンパンジーを用いて行われてきたが、チンパンジーはワシントン条約で保護されていること、飼育費用は高額で、飼育施設の確保も困難であることから、十分な研究ができなかった。近年、ヒト肝細胞をマウスに移植することによって、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞へと置換されたヒト肝細胞キメラマウスが開発され⁸⁾⁹⁾、本学でも、吉里らの研究により、uPA-SCIDマウスを用いたヒト肝細胞キメラマウスの作製が可能となった¹⁰⁾。uPA-SCIDマウスは、アルブミン(Alb)プロモーター下にurokinase-type plasminogen activator(uPA)を遺伝子導入したAlb-uPA Tgマウスと重症免疫不全を呈するsevere combined immune deficient(SCID)マウスを交配

させ、作製されたマウスであり、生後uPAが肝細胞内で高発現することによりマウスの肝細胞は壊死に陥り、肝不全を呈する。このuPA-SCIDマウスに、ヒト肝細胞を経脾的に移植することにより、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが作製される(図3)。

本マウスの尾静脈よりHBV感染患者血清を接種すると、接種後2週目よりマウス血清中のHBV DNAは検出可能となり、その後徐々に上昇し、8~10log copies/ml程度に達し、24週間以上感染は持続する(図4)。このHBV持続感染マウスにLMVを経口投与すると、マウス血清中のHBV DNAは速やかに低下することから、HBVが持続感染したヒト肝細胞キメラマウスを用いて薬効評価が可能であることが示された⁵⁾。

野生株に対するTDFの抗ウイルス効果の検討

はじめに、各種核酸アナログの抗ウイルス効果を比較するため、HBV野生株であるClone 1(野

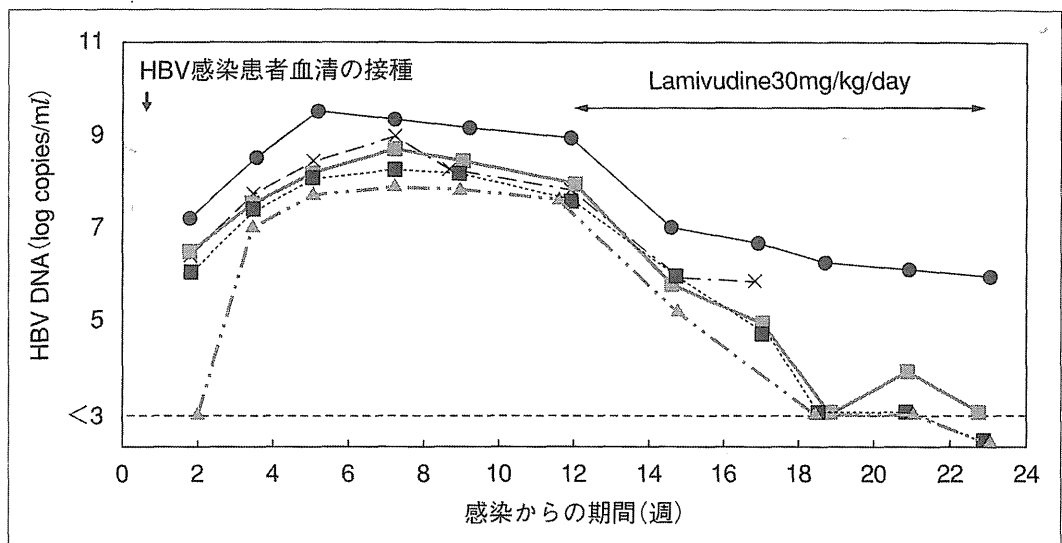


図4 HBV持続感染キメラマウスの作製とLMVによる抗ウイルス効果
ヒト肝細胞キメラマウスにHBV感染患者血清を接種。マウス血清中のHBV DNAは徐々に上昇し、8~10log copies/mlに達した。このマウスに対し、感染12週目よりLMVを経口投与したところ、マウス血清HBV DNAは減少し、LMVの抗ウイルス効果が確認された。(文献⁵⁾より引用改変)

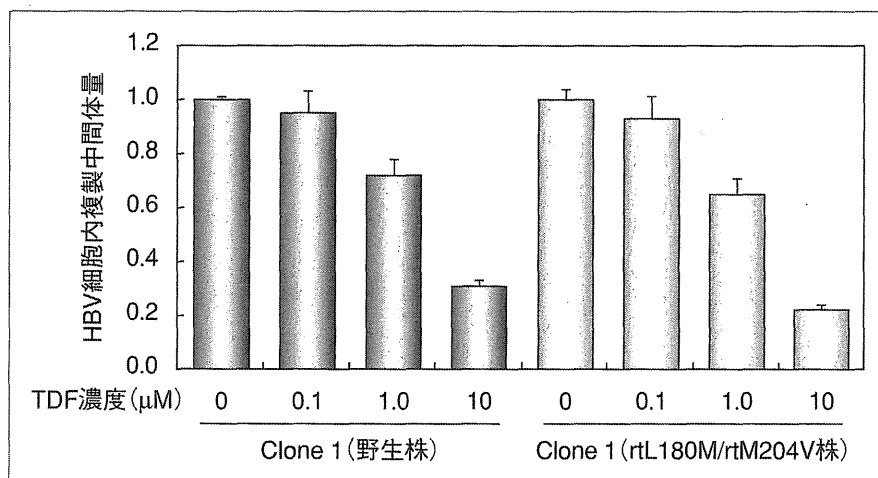


図5 *In vitro*におけるTDFの抗ウイルス効果の検討(野生株 vs. LMV耐性株)
*In vitro*のHBV複製モデルを用いて、TDF濃度の変化に伴うHBV細胞内複製中間体量の変化について検討。いずれのクローンにおいても複製中間体はTDFの濃度依存的に低下し、その低下の程度は、野生株、LMV耐性株いずれにおいてもほぼ同程度であった。

生株)を用いて、*in vitro*での検討を行った。野生株のHBV発現プラスミドをHepG2細胞にトランスフェクションし、24時間後より培養上清中に核酸アナログを添加し、添加72時間後の細胞内の複製中間体量の変化をreal time PCR法を用いて検討した。その結果、図5に示すように、TDFの濃度依存的にHBV細胞内複製中間体量は減少することが確認された。そこで、*in vitro*における結果を確認するため、培養上清より産生させたHBV粒子(野生株)をヒト肝細胞キメラマウス

に接種し、*in vivo*での抗ウイルス効果についても検討した。使用した3頭いずれにおいても、マウス血中のHBV DNA量はTDF投与により速やかに低下し、4週間で平均3.6logの低下を認めた。その他3種類の核酸アナログ製剤を使用した場合と比較すると、LMV投与では4週間で3.0log、ADVでは1.7log、ETVでは4.2logの低下であったことから、TDFの抗ウイルス効果はほぼ同等であるものと考えられた(図6)。これらの結果から、TDFは核酸アナログ初回投与例において、

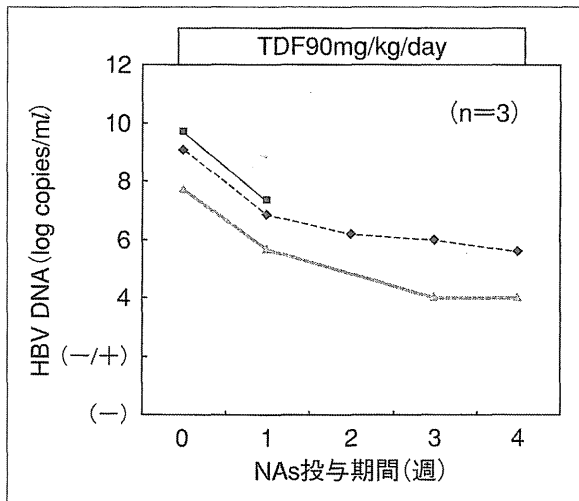


図6 *In vivo*における野生株に対するTDFの抗ウイルス効果の検討

野生株の感染したヒト肝細胞キメラマウスに対してTDF投与し、マウス血清HBV DNAの変化を検討。HBV DNAはTDF投与により、速やかに低下し、4週間で平均3.6log copies/mlの低下を認めた。

臨床的にも有効である可能性が示された。

LMV耐性株に対する TDFの抗ウイルス効果の検討

B型慢性肝炎症例に対し、LMV長期投与を行うと、投与1年で約20%、2年で30~40%の患者に耐性ウイルスが出現し、これらの耐性ウイルス出現に伴うbreak through hepatitisを起こすことが知られている。本検討では、このLMV耐性変異として頻度が高いrtL180M/rtM204V株を作製し、*in vitro*および*in vivo*の検討を行った。rtL180M/rtM204V株のプラスミドをHepG2細胞にトランスフェクションし、TDFによる抗ウイルス効果を検討したところ、野生株と同様、TDFの濃度依存的な抗ウイルス効果が確認された。そこで、野生株とのTDF感受性を比較すると、各濃度におけるHBV細胞内複製中間体の変化率はほぼ同程度であり、LMV耐性株に対して、野生株とほぼ同等の抗ウイルス効果が期待できるものと考えられた(図5)。そこで、野生株同様、*in vitro*において作製したLMV耐性HBV粒子をヒト肝細胞キメラマウスの尾静脈より接種し、LMV耐性HBV持続感染マウスを作製し、LMVおよびTDFの経口投与を行った。その結果、2週間のTDF投与により、マウス血中のHBV DNA量は1.6logの低下を認めたが、LMV投与ではまった

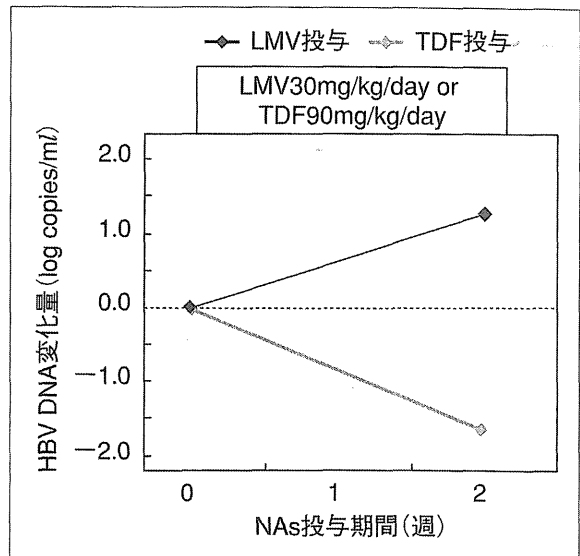


図7 *In vivo*におけるLMV耐性株に対するTDFの抗ウイルス効果の検討

LMV耐性変異をもつrtL180M/rtM204V株を感染させたヒト肝細胞キメラマウスに対してTDF投与し、マウス血清HBV DNAの変化を検討。HBV DNAはTDF投与により、2週間で1.6log copies/mlの低下を認めた。

くHBV DNAの低下は認められなかった(図7)。

LMV/ADV耐性株を用いた 抗ウイルス効果の検討

現在、B型慢性肝炎患者において、前述の如く、LMV耐性を認めた症例に対してはLMVとADVの併用療法が行われている。本邦では、ADVはLMV耐性症例に対する対応策として開発されたことから、現在もLMV耐性例に対してLMVとの併用療法が行われていることが多い。同治療法は、ADV単独投与に比べ、耐性獲得の頻度が低いとされているものの、長期投与例では、LMV単独投与例と同様に、LMV, ADVのいずれにも耐性を示す多剤耐性変異株が出現することがわかってきた⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。そこで、LMV/ADV両剤耐性株として知られるrtA181T/rtN236T株を作製し、同様の検討を行った。LMV/ADV耐性株をトランスフェクションしたHepG2細胞に対し、TDFを添加したところ、TDFの濃度依存的にHBV細胞内複製中間体の減少が確認でき、その減少率は野生株とほぼ同程度であった(図8)。そこで、同ウイルスクローンをを用いて同様の検討を*in vivo*において施行した。その結果、TDF投与にて2週間で3.0logの低下を認め、野生株と比較

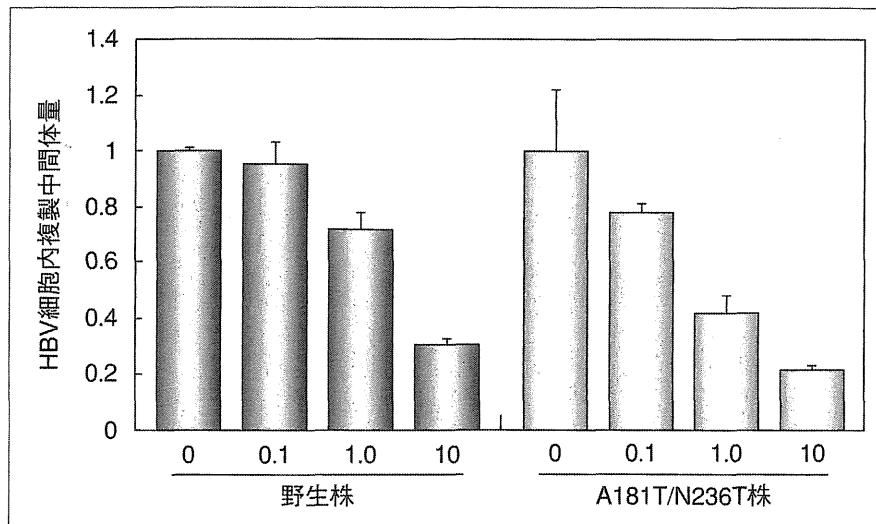


図8 *In vitro*におけるTDFの抗ウイルス効果の検討(野生株 vs. LMV/ADV耐性株)
In vitro HBV複製モデルを用いて、TDFによる野生株およびLMV/ADV耐性株への抗ウイルス効果について検討。いずれのクローンにおいても複製中間体はTDFの濃度依存的に低下し、その低下の程度は、ほぼ同程度であった。

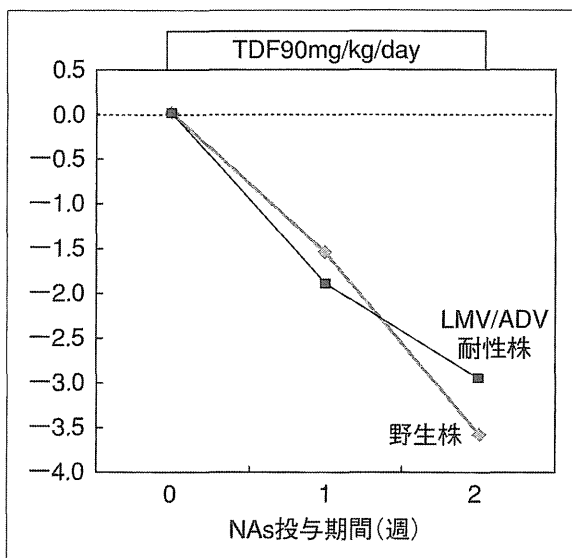


図9 *In vivo*における野生株とLMV/ADV耐性株(A181T/N236T株)のTDF感受性の比較
 野生株およびLMV/ADV耐性株の感染したヒト肝細胞キメラマウスに対してTDF投与。マウス血清HBV DNAの変化を検討したところ、いずれのHBVクローンにおいても速やかなHBV DNAの低下が確認され、その低下量も野生株で $-3.6\log$ 、LMV/ADV耐性株で $-3.0\log$ と同等の低下が認められた。

してもほぼ同程度の感受性であることが示された(図9)。

今後の展望

現在、B型慢性肝炎に対する新たな治療薬と

して、TDFの治療が進行中である。TDFは、海外での使用報告からみると、HBVに対する抗ウイルス効果は非常に強力であり、また耐性株の出現率も低いと考えられる。2000年以降、B型慢性肝炎治療において核酸アナログ製剤は欠かせない治療薬となっており、各種核酸アナログ製剤を用いることによって、多剤耐性を獲得したHBVの増加が懸念されている。本研究では、野生株に加え、LMV耐性株、LMV/ADV耐性株に対するTDFの抗ウイルス効果について検討を行った。しかしながら、本研究に用いた耐性ウイルスは、これまで報告されている耐性ウイルスのごく一部にすぎず、その他の耐性変異についてもTDFが良好な抗ウイルス効果を示すか否かを検討していく必要がある。今後、TDFが臨床で使用可能となることが予測されることから、TDFに対して耐性を示す変異株についても検討を追加し、核酸アナログを用いた新たな治療戦略を構築していくことが重要であると考えられた。

文献

- 1) Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV : standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007 ; 46 : 254.

- 2) Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, et al. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol* 2007 ; 79 : 1811.
- 3) Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, et al. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 ; 50 : 3867.
- 4) Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 1593.
- 5) Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005 ; 42 : 1046.
- 6) Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998 ; 27 : 1670.
- 7) Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, et al. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996 ; 24 : 714.
- 8) Brown JJ, Parashar B, Moshage H, et al. A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice. *Hepatology* 2000 ; 31 : 173.
- 9) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001 ; 7 : 927.
- 10) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004 ; 165 : 901.
- 11) Perrillo R, Hann HW, Mutimer D, et al. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2004 ; 126 : 81.
- 12) Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, et al. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy : two-year follow-up. *J Hepatol* 2008 ; 48 : 923.

* * *

Reduced risk of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in aged patients with chronic hepatitis C is limited to sustained virological responders

Y. Imai,¹ S. Tamura,² H. Tanaka,³ N. Hiramatsu,⁴ S. Kiso,⁴ Y. Doi,⁵ M. Inada,⁶ T. Nagase,⁷ T. Kitada,⁸ K. Imanaka,⁹ K. Fukuda,¹ T. Takehara,⁴ A. Kasahara¹⁰ and N. Hayashi⁴ ¹Department of Gastroenterology, Ikeda Municipal Hospital, Osaka; ²Department of Internal Medicine, Minoh City Hospital, Osaka; ³Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, Aichi; ⁴Department of Gastroenterology and Hepatology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka; ⁵Department of Internal Medicine, Otemae Hospital, Osaka; ⁶Department of Internal Medicine, Toyonaka Municipal Hospital, Osaka; ⁷Department of Internal Medicine, Suita Municipal Hospital, Osaka; ⁸Department of Internal Medicine, Itami Municipal Hospital, Osaka; ⁹Department of Gastroenterology, Osaka Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka; and ¹⁰Department of General Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Received February 2009; accepted for publication April 2009

SUMMARY. This study was undertaken to investigate the effect of interferon (IFN) monotherapy on the risk of hepatocellular carcinoma (HCC) in aged-patients with chronic hepatitis C. Seven hundred and twenty-five patients with histologically proven chronic hepatitis C were enrolled in this retrospective cohort study; 531 received IFN monotherapy for 6 months between 1992 and 1995, and 157 were collected as a historical control. The effect of IFN therapy on the development of HCC was compared between the patients with chronic hepatitis C under 60 years old (non-aged group, $n = 531$) and those 60 and over (aged group, $n = 194$). A stepwise Cox proportional-hazards regression analysis in the non-aged group revealed that IFN therapy (risk ratio 0.52, 95% CI 0.33–0.81, $P = 0.004$), older age ($P = 0.001$), and higher histological stage

($P < 0.001$) were independent factors associated with the development of HCC. In the aged-group, only higher histological stage ($P = 0.002$) and male gender ($P = 0.011$), but not IFN therapy (risk ratio 0.77, 95% CI 0.42–1.40, $P = 0.386$), were identified as independent risk factors for HCC, although HCC was significantly reduced when sustained virological response (SVR) was obtained (risk ratio 0.23, 95% CI 0.08–0.64, $P = 0.005$). In conclusion, inhibitory effect of IFN on development of HCC in the patients with chronic hepatitis C aged 60 and over was limited to the patients achieving SVR when treated with 6 months-IFN monotherapy.

Keywords: aged patients, chronic hepatitis C, hepatocellular carcinoma, interferon, sustained virological response.

INTRODUCTION

In Japan, based on the epidemiological surveillance as well as the study on molecular tracing of hepatitis C virus (HCV), HCV infection is considered to spread from the 1920s and to expand more after World War II [1–5]. The data of first-time blood donor candidates in Osaka demonstrated that the prevalence of anti-HCV antibodies among the candidates born in 1925–1935 was 7–10%, which was much higher

than the prevalence of anti-HCV antibodies among the younger population [6]. Accordingly, chronic hepatitis C patients have become aged in Japan and HCV-related hepatocellular carcinoma (HCC) patients have also been shown to be old with a peak around age 70 and tended to decrease [1,3,5]. More importantly, the main cause of death in the patients with chronic hepatitis C has been reported to be HCC [7–10].

In the 1990s, interferon (IFN) therapy was used for the treatment of the patients with chronic hepatitis C worldwide and it has been shown by many studies including our reports that IFN therapy reduced the risk of HCC in patients with chronic hepatitis C [7,11–17]. This inhibitory effect of IFN therapy on hepatocarcinogenesis is notable when sustained virological response (SVR) was obtained, although SVR rate of IFN monotherapy was not very high. It has been also

Abbreviations: IFN, interferon; HCC, hepatocellular carcinoma; SVR, sustained virological response; HCV, hepatitis C virus; non-SVR, nonsustained virological response.

Correspondence: Yasuharu Imai, MD, PhD, Department of Gastroenterology, Ikeda Municipal Hospital, 3-1-18, Johnan, Ikeda, Osaka 563-8510, Japan. E-mail: yasuiimai@leto.eonet.ne.jp

reported that HCC development was significantly reduced in the patient achieving SVR as compared with those without SVR in chronic hepatitis C patients treated with IFN and ribavirin [18].

For the treatment of the patients with chronic hepatitis C, a combination of peginterferon and ribavirin has become a standard therapy, which has a high SVR rate [19–21]. However, the combination treatment has several adverse effects such as haemolytic anaemia which may not be tolerable for aged patients with chronic hepatitis C. On the other hand, aging is a significant risk factor for HCC in chronic hepatitis C patients. Accordingly, it is an important issue whether IFN monotherapy could reduce incidence of HCC in aged patients with chronic hepatitis C. Recently, Arase *et al.* [22] reported that long-term IFN monotherapy using low-dose of natural IFN- α was effective in preventing hepatocarcinogenesis in aged patients with chronic hepatitis C. In contrast, the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis (HALT-C) Trial has shown that maintenance peginterferon therapy for 3.5 years did not reduce the incidence of HCC and the rate of disease progression in chronic hepatitis C patients with bridging fibrosis or cirrhosis who failed to respond to the combination therapy of peginterferon- α 2a and ribavirin [23,24].

We conducted a long-term multicenter retrospective cohort study to clarify the effect of 6-month IFN monotherapy on the incidence of HCC in aged patients with chronic hepatitis C.

MATERIAL AND METHODS

Patients

This study was conducted at Osaka University Hospital and six university-affiliated hospitals. IFN-treated patients consisted of 568 consecutive patients with chronic hepatitis C who had undergone liver biopsy 1 week to 2 months before IFN therapy and received either human lymphoblastoid IFN, recombinant IFN- α 2a or recombinant IFN- α 2b for 6 months between 1992 and 1995. The control group consisted of 158 consecutive patients with chronic hepatitis or cirrhosis who had undergone liver biopsy between January 1986 and December 1989, when IFN therapy had not been available in Japan. All the patients were positive for anti-HCV. The inclusion criteria in this study were as follows: (1) histological diagnosis of chronic hepatitis or cirrhosis; (2) no history of clinical signs at entry into the study of complications of cirrhosis, i.e. ascites, jaundice, encephalopathy, or variceal bleeding; (3) no previous IFN therapy; (4) no evidence of HCC at entry into the study as assessed by ultrasonography and/or computed tomography; (5) absence of serum hepatitis B surface antigen; (6) absence of co-existing liver diseases such as autoimmune hepatitis or primary biliary cirrhosis and (7) absence of excessive alcohol consumption (>80 g/day).

Sustained virological response was defined as persistent HCV RNA negativity during IFN therapy and follow-up. Patients showing positive HCV RNA after IFN therapy were classified as nonsustained virological response (non-SVR). In the patients with non-SVR, patients whose ALT levels decreased to the normal range and remained normal during IFN therapy were classified as transient biochemical response and patients without a decrease of ALT levels of the normal range during the therapy were classified as zbiochemical nonresponse.

Hepatitis C virus antibody was measured by first-, second-, or third-generation enzyme-linked immunosorbent assays (Ortho Diagnostics, Tokyo, Japan). Serum HCV RNA was measured by reverse transcription polymerase chain reaction or complementary DNA assay [25].

Follow-up

The starting date of follow-up of the patients was defined as the date of liver biopsy. Abdominal ultrasonography or computed tomography and biochemical examinations including α -fetoprotein were performed every 3–6 months during follow-up equally in the IFN-treated and control patients. The diagnosis of HCC was confirmed by needle biopsy, by surgically resected tumour specimens, or by typical radiological findings on hepatic angiography or dynamic computed tomography. In the patients residing in Osaka whose follow-up data were not obtained, the Osaka Cancer Registry was used to determine whether HCC had occurred and the data were available until the end of 2002 in this study [13,26]. Accordingly, we decided to use the date of the development of HCC or the end of 2002 as the end of follow-up. As the longest observation period of the patients in the IFN group was 11 years, only the follow-up data for the first 11 years were considered in the control group. The study protocol was in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (revised in 1983) and approved by the Ethical Committee of the Ikeda Municipal Hospital.

Histological evaluation

The sections were stained with haematoxylin–eosin and Azan–Mallory and histology of liver biopsy specimens was scored by two authors in a blinded manner using two scoring methods as described before [13]. Briefly, fibrosis score of Desmet *et al.* was used for the assessment of histological staging and a total score of histological activity (components 1–3) using the Knodell histological activity index was used for the assessment of histological grading [13,27,28].

Statistical analysis

Patients who did not complete the treatment protocol were included for the analysis on an intention-to-treat basis. The chi-square test and Student's *t*-test were used to compare the

baseline characteristics. The Kaplan–Meier method was used to calculate the cumulative incidence of HCC, and the log-rank test was used to compare the cumulative incidence of HCC between the groups. To estimate independent risk factors for the development of HCC, a stepwise Cox proportional-hazards regression analysis was used. For the analysis, IFN therapy, age, gender, and histological staging and activity scores were used as variables. A *P* value <0.05 was considered statistically significant. Data are presented as the mean \pm SD and were analysed using SPSS version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Table 1 shows the baseline characteristics of the aged (60 years old and over) and non-aged (under 60 years old) groups. Both the histological stage and activity were significantly higher in the aged group than in the non-aged group. The proportion of male patients of the non-aged group was significantly higher than that of the aged group. In Table 2, baseline characteristics of controls and IFN-treated patients in the aged and non-age groups were compared. In the non-aged group, age at entry, proportion of male gender, histological activity score, serum ALT level and platelet count did not differ between the control and IFN-treated patients. However, histological stage of IFN-treated patients was less advanced as compared with that of the control patients. In the age-group, age at entry, proportion of male gender, histological stage and activity, serum ALT level and platelet count did not differ between the control and IFN-treated patients.

During the follow-up period, HCC was found in 35 controls and 44 IFN-treated patients among the non-aged group

and in 14 controls and 48 IFN-treated patients among the aged group. The median tumour sizes of HCC in controls and IFN-treated patients at the time of discovery on ultrasonography or computed tomography were 22 mm (range, 10–55 mm) and 19 mm (range, 8–52 mm) respectively ($P \geq 0.2$). In the non-aged group, the cumulative incidence of HCC estimated by the Kaplan–Meier Method of IFN-treated patients was significantly lower than that of control patients (log-rank test, $P < 0.001$, Fig. 1a), whereas there was no difference in the cumulative incidence of HCC between controls and IFN-treated patients in the aged group (log-rank test, $P = 0.498$, Fig. 1b). The cumulative incidence of HCC of SVR and non-SVR patients and controls of the aged and non-aged groups are shown in Fig. 2. The 10-year incidences of HCC for controls, non-SVR and SVR patients in the non-aged group were 30.1%, 15.8%, 4.5% respectively (log-rank test, $P < 0.001$, Fig. 2a). Also, the 10-year incidences of HCC for controls, non-SVR and SVR patients in the aged group were 39.1%, 38.9%, 12.7% respectively (log-rank test, $P = 0.015$, Fig. 2b).

In Table 3, risk ratios for the development of HCC calculated by a stepwise Cox regression analysis in the aged and non-aged patients with chronic hepatitis C according to virological and biochemical responses to IFN are summarized. In the 410 IFN-treated patients of non-aged group, 134 patients (32.7%) achieved SVR and the remaining 276 showed non-SVR (Table 3). Of this 276 patients showing non-SVR, 163 showed transient biochemical response and 113 showed biochemical nonresponse during the IFN treatment. On the other hand, 41 (25.9%) of 158 IFN-treated patients of the aged group obtained SVR and the other 117 did not obtain SVR (Table 3). Of the 117 non-SVR patients, 57 showed transient biochemical response and 60

Table 1 Baseline characteristics of aged and non-aged patients with chronic hepatitis C

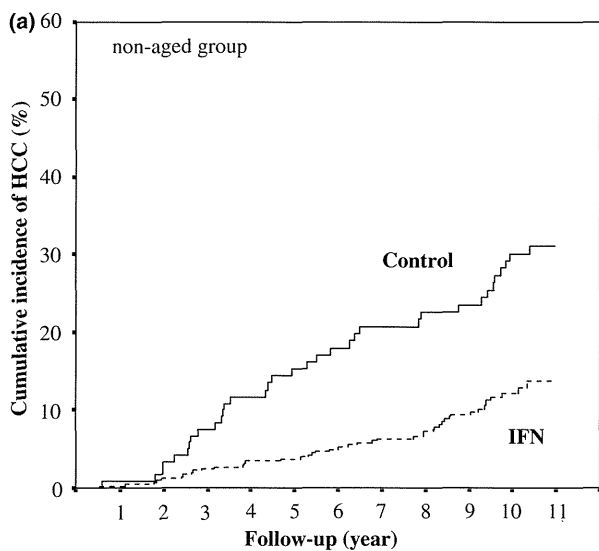
	Non-aged group (<i>n</i> = 531)	Aged group (<i>n</i> = 194)	<i>P</i> value
Control group (<i>n</i>)/IFN group (<i>n</i>)	121/410	36/158	0.262
Age	48.1 \pm 9.7	63.7 \pm 3.3	<0.001
Gender			
Male	353	108	0.009
Female	178	86	
Histological stage*			
F0, 1	186	37	0.001
F2	157	69	
F3	141	69	
F4	47	19	
Histological activity [†]			
<10	329	104	0.049
≥ 10	202	90	
ALT (IU/L)	117 \pm 86	104 \pm 60	0.053
Platelete count ($10^4/\mu\text{L}$)	15.4 \pm 5.6	14.4 \pm 5.6	0.040

*According to Desmet *et al.*²⁷ [†]Based on components 1–3 of the Knodell histological activity.

Table 2 Baseline characteristics of controls and IFN-treated patients in aged and non-aged groups

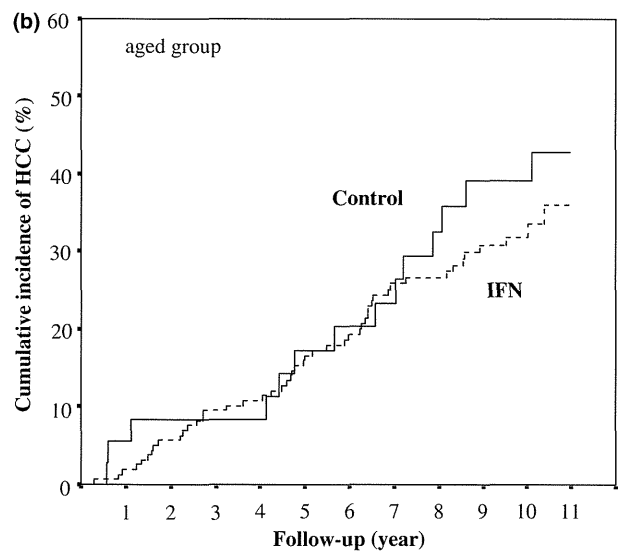
	Non-aged group			Aged group		
	Controls	IFN-treated	<i>P</i> value	Controls	IFN-treated	<i>P</i> value
<i>n</i>	121	410		36	158	
Age	48.4 ± 10.5	48.0 ± 9.4	0.736	64.6 ± 3.6	63.5 ± 3.2	0.059
Gender						
Male	75	278	0.273	22	86	0.579
Female	46	86		14	72	
Histologic stage*						
F0,1	27	159	<0.001	8	29	0.933
F2	28	129		12	57	
F3	47	94		12	57	
F4	19	28		4	15	
Histologic activity†						
<10	72	257	0.525	20	84	0.854
≥ 10	49	153		16	74	
ALT (IU/L)	127 ± 80	114 ± 88	0.132	110 ± 85	103 ± 53	0.523
Platelete count (10 ⁴ /μL)	15.2 ± 6.1	15.4 ± 5.4	0.766	15.0 ± 5.4	14.3 ± 5.7	0.486
HCV RNA load						
High	ND‡	166		ND‡	54	
Low	ND‡	116		ND‡	30	
HCV RNA serotype						
1	ND‡	231		ND‡	90	
2	ND‡	102		ND‡	32	

*According to Desmet *et al.* 27 †Based on components 1–3 of the Knodell histologic activity. ‡Not done.



Patients at risk

Control	121	120	116	110	101	94	90	86	82	81	74	71
IFN	410	408	403	398	390	388	358	319	301	266	134	2



Patients at risk

Control	36	34	33	33	31	28	26	25	21	18	17	15
IFN	158	155	149	143	138	129	115	98	91	77	43	1

Fig. 1 Cumulative incidence of hepatocellular carcinoma in IFN-treated (dotted line) and control (solid line) patients of the non-aged group (a) and the aged group (b). A log-rank test of the two curves showed a significant difference in the non-aged group (*P* < 0.001), whereas no significant difference was observed in the aged group (*P* = 0.498).

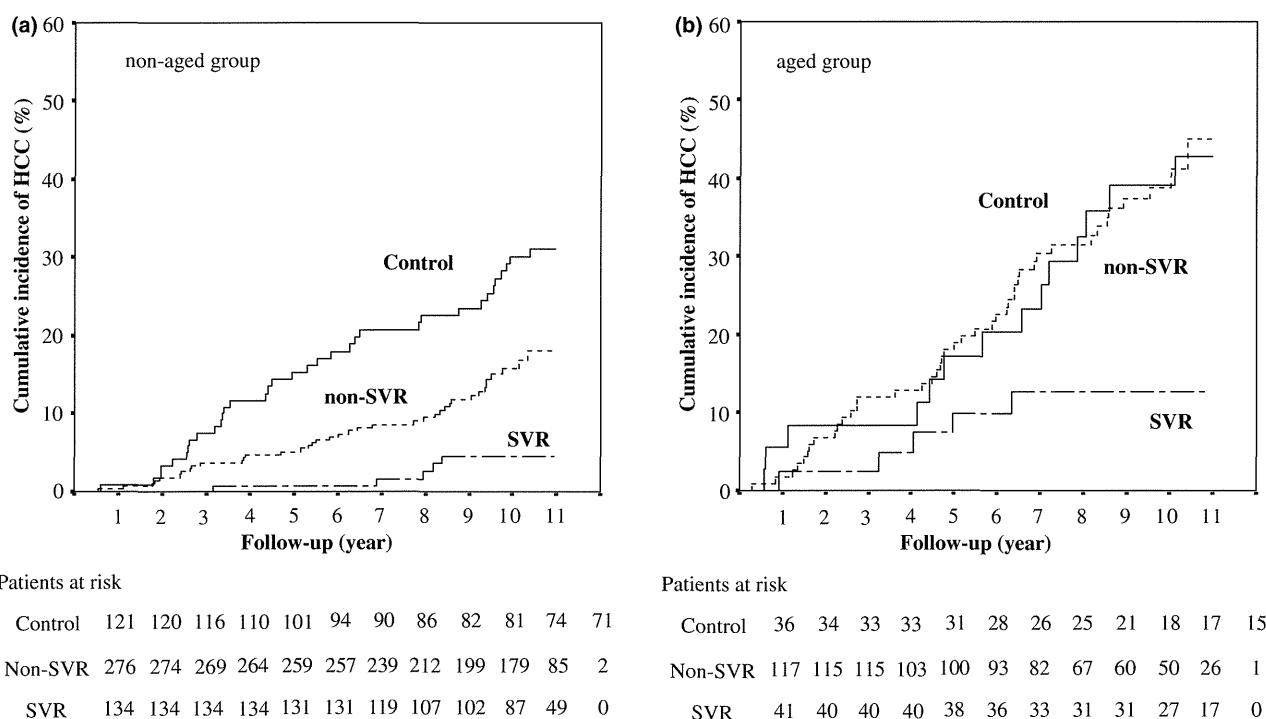


Fig. 2 (a) Cumulative incidence of hepatocellular carcinoma categorized by sustained virological response (dashed line), nonsustained virological response (dotted line), and controls (solid line) of the non-aged group (a) and the aged group (b). A log-rank test of the three curves showed a significant difference between these groups (non-aged group, $P < 0.001$; aged group, $P = 0.015$).

showed biochemical nonresponse. In the non-aged group, stepwise Cox regression analysis identified IFN therapy (risk ratio 0.52, 95% CI 0.33–0.81, $P = 0.004$), older age (risk ratio 1.07, 95% CI 1.03–1.10, $P = 0.001$), and higher histological stage (score 3 or 4) (risk ratio 4.03, 95% CI 2.41–6.76, $P < 0.001$) as independent risk factors associated with the development of HCC. In the non-aged group, the development of HCC was strongly suppressed when SVR was achieved (risk ratio 0.20, 95% CI 0.08–0.50, $P < 0.001$) (Table 3). In the patients with transient biochemical response of the non-SVR group among the non-aged group,

HCC development was also significantly reduced (risk ratio 0.47, 95% CI 0.26–0.86, $P = 0.015$). In the aged group, stepwise Cox regression analysis revealed that only higher histological stage (score 3 or 4) (risk ratio 2.27, 95% CI 1.36–3.78, $P = 0.002$) and male gender (risk ratio 2.00, 95% CI 1.17–3.41, $P = 0.011$) were independent factors responsible for the development of HCC (Table 3). Although IFN therapy was not identified as an independent variable for HCC, the risk of HCC was significantly decreased in the patients with SVR in the aged group as shown in the Table 3 (risk ratio 0.23, 95% CI 0.08–0.64, $P = 0.005$). In the

Table 3 Risk ratios for hepatocellular carcinoma in aged and non-aged patients with chronic hepatitis C according to virological and biochemical responses to interferon*

	Non-aged group ($n = 531$)				Aged group ($n = 194$)			
	n	Risk ratio	95% CI	P value	n	Risk ratio	95% CI	P value
Control group	121	1.00			36	1.00		
IFN group	410	0.52	0.33–0.81	0.004	158	0.77	0.42–1.40	0.388
Sustained virological response	134	0.20	0.08–0.50	0.001	41	0.23	0.08–0.64	0.005
Nonsustained virological response	276	0.65	0.41–1.03	0.068	117	1.07	0.58–1.97	0.821
Transient biochemical response [†]	163	0.47	0.26–0.86	0.015	57	0.67	0.32–1.43	0.303
Biochemical nonresponse [†]	113	0.86	0.51–1.47	0.584	60	1.46	0.77–2.78	0.245

*A stepwise Cox regression analysis was carried out by using interferon therapy, age, gender, and histologic stage and histologic activity scores as variables. [†]Nonsustained virological response was classified into transient biochemical response and biochemical nonresponse according to the ALT response during the interferon treatment.