

教育講演

7. ウイルス性肝炎の治療の進歩

泉 並木

日本内科学会雑誌 第 101 卷 第 9 号別刷

2012 年 9 月 10 日

教育講演

7. ウイルス性肝炎の治療の進歩

泉 並木

Key words : B型慢性肝炎, *de novo*肝炎, C型慢性肝炎

1. B型肝炎の治療

1) B型慢性肝炎の治療すべき症例の選択

わが国ではB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) のキャリアが1.4%程度にみられ、ごく一部が肝硬変や肝臓へと進展する。従来、HBe抗原のセロコンバージョンが臨床的治療の指標と考えられていたが、近年HBe抗原陰性でALT (alanine aminotransferase) 値が正常者にも肝臓癌がみられることが明らかになった。HBe抗原が陰性化した後に、reactivationがおこりHBVDNA (hepatitis B virus deoxyribonucleic acid) の上昇とともに肝硬変や肝臓への進行がみられるというB型肝炎の自然史が明らかになってきている (図1)。

さらにインターフェロン (IFN) に加えて核酸アナログ内服によってHBVの増殖が抑制され、病態の進展が防止できることが明らかになった。このような治療法の進歩によって抗ウイルス療法の対象となる症例の範囲がガイドライン上日本でも海外でも広がってきている。B型肝炎の抗

ウイルス療法は最終的に肝硬変、肝不全への進展阻止と肝細胞癌の防止である。多くの大規模コホート研究によって、抗ウイルス療法が長期予後を改善することが明らかになっている。

台湾からHBs抗原陽性でHBe抗原陽性の場合にはHBe抗原陰性例よりも3倍の肝臓癌リスクがあり、HBe抗原陽性であれば陰性者よりも発癌リスクが9.6倍であることが報告された¹⁾。したがってセロコンバージョンによって肝臓癌が低下し治療目標として重要であることが認識された。さらにHBVDNA量が自然史に重要な指標になることが明らかになった。未治療のHBs抗原陽性者を経過観察し、HBVDNA陰性であった場合の肝硬変への進展は338.8例/10,000人・年であったのに対し、300 copies/ml~4 log copies/mlでは429.9例/10,000人・年になり、4~5 log copies/mlでは774例/10,000人・年、5~6 log copies/mlでは1,878.6例/人・年、6 log copies/ml以上では2,498.3例/人・年となりHBVDNA量が高いほど肝硬変への移行率が高くなることが示された²⁾。HBVDNA陰性例と比較しHBVDNA量が4~5 log copies/mlで2.5倍、5~6 log copies/mlで5.6倍、

武蔵野赤十字病院消化器科

109th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine : Educational lecture : 7. Cutting edge of the treatment for viral hepatitis.

Namiki Izumi : Department of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Japan.

本講演は、平成24年4月13日 (金) 京都市・みやこめっせにて行われた。

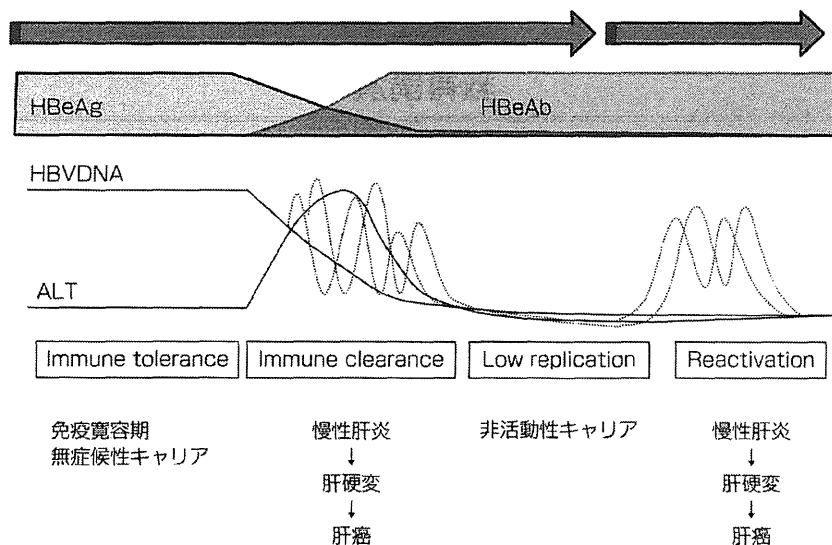


図 1. B型肝炎の自然史

6 log copies/ml以上で6.5倍となる。さらに、Chenらが肝発癌を解析したところ、HBVDNA陰性例と比較し、HBVDNAが4~5 log copies/mlでは2.3倍、5~6 log copies/mlで6.6倍、6 log copies/ml例で6.1倍であることが認められた(図2)³⁾。したがって高ウイルス状態であることが肝病変の進行や肝発癌に関わる因子であることが示されている。

最近HBe抗原が陰性化してHBVDNA量が4.0 log copies/ml未満でALTが正常値の非活動性キャリアでも13年の経過観察でHBs抗原陰性例よりも4.6倍の肝発癌率であることが示された⁴⁾。このことからALT値が正常であってもHBVDNAが陽性の場合には肝硬変への進展や肝発癌リスクがあると考えられる。

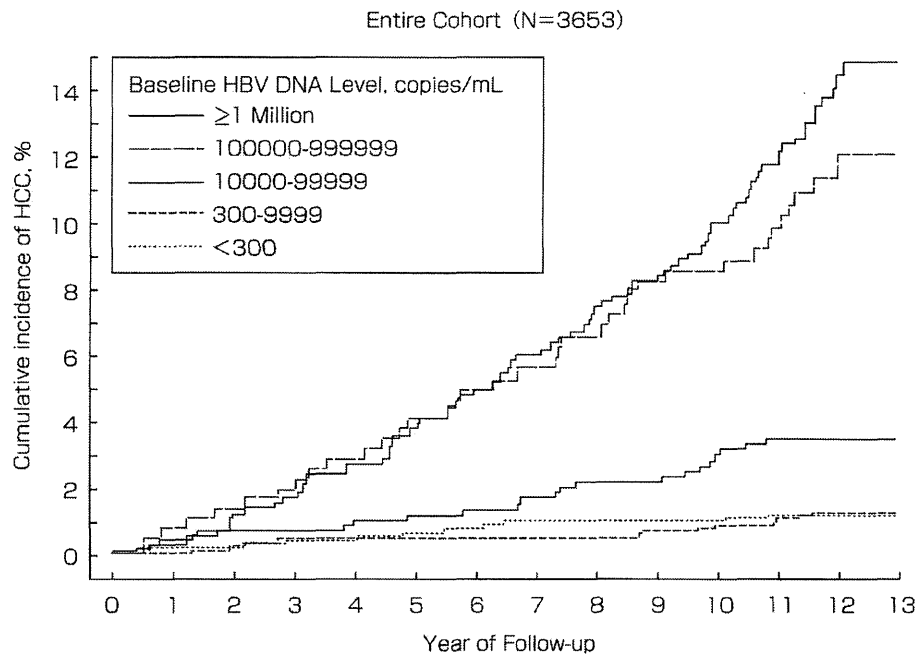
データマイニング法を用いてわれわれの施設でのB型慢性肝炎の通院症例391例を解析すると、多変量解析で年齢が40歳以上であること、HBVDNA量が4.0 log copies/ml以上、血小板数が15万/ μ l以下であることが、肝発癌のリスクとしてあげられた。AST (aspartate aminotransferase) の値は肝発癌予測にはいってこず、

HBVDNA量がわが国においても重要と考えられた。

2) インターフェロン (IFN) による肝発癌防止

(1) 効果

HBe抗原陽性のB型慢性肝炎ではIFNによってセロコンバージョンが得られるのは約20~30%前後に過ぎないが、治療終了後も80%以上の例でセロコンバージョンが持続する。IFNによる肝発癌抑制効果については一致した結果が得られていない。無作為比較によるIFNの肝発癌抑制効果はその有用性を証明できなかった⁵⁾。これは症例数が少なかった影響がある。一方、背景をマッチさせたケースコントロール研究では、IFN治療例で肝発癌が有意に低下していた⁶⁾。IFNによる肝発癌抑制効果についての11の論文のメタ解析が報告されている⁷⁾。それによると、IFN治療1,006例から肝癌は52例、非IFN群の1,076例からの肝癌が126例みられ、IFN治療によって肝発癌が有意に抑制されていた⁷⁾。さらにMiyakeらの8つの論文のメタ解析では、IFNによる肝発癌抑制効果はアジア人、非治療例の発癌率が10%以上、HBe



No. at Risk

Baseline HBV DNA Level, copies/mL

≥1 Million	627	621	611	604	593	582	571	561	550	541	528	513	499	414
100000-999999	349	346	342	338	333	327	321	317	310	304	302	294	288	228
10000-99999	643	637	633	633	627	625	622	615	609	606	597	588	586	490
300-9999	1161	1155	1146	1139	1137	1131	1129	1123	1119	1113	1102	1091	1082	879
<300	873	865	862	854	850	845	836	826	823	819	814	807	802	720

図2. B型肝炎におけるHBVDNA量別肝発癌率 (文献3より引用)

抗原陽性が70%以上含まれる対象であった⁸⁾。肝硬変例では7論文のメタ解析が行われ、IFN投与例では非投与例と比較して肝発癌の低下が認められた⁹⁾。最近、Sungらは12論文のメタ解析を行い、IFN治療1,292例から肝発癌が59例(4.6%)であり、非治療1,450例の肝発癌が131例(9%)であったため、IFN治療によって発癌リスク比が0.66に低下すると報告した^{10~20)}(表1)。この中でサブ解析を行うと肝硬変での抑制率が高く(11.6% vs 21.5%)、肝硬変でない場合にはIFN治療群での肝発癌率が0.9%、非IFN群では1.1%で有意差がみられなかった。したがって、IFNによる肝発癌抑止効果は、肝硬変などの発癌

リスクが高い症例において顕著にみられる²¹⁾。

3) 核酸アナログによる肝発癌防止効果

核酸アナログはHBVを排除するのではなく増殖抑制効果が作用の主体である。そこで長期内服によって肝病変の進展や肝発癌が防止できるか否かが重要なポイントとなる。

Liawらは無作為比較試験を行いB型肝炎肝硬変651例を対象としてラミブジンの長期効果を解析した²²⁾。その結果、ラミブジン内服によって肝機能の悪化を抑制し、ラミブジン非投与例での肝発癌率は7.4%であったのに対し、ラミブジン投与例では3.9%に低下していることを示した。これは世界で最初に核酸アナログ投与によって肝癌

表 1. B型慢性肝炎におけるインターフェロン (IFN) による肝発癌抑制効果のメタ解析 (文献 10, 11 による)

	インターフェロン (n/N)	コントロール (n/N)	観察期間 (年)	リスク比	95%信頼区間
Fattovich ⁵ (1997) ¹¹⁾	4/40	6/50	7.2	0.83	0.25 ~ 2.75
Krogsgaard ⁵ (1998) ¹²⁾	2/210	1/98	4.7	0.93	0.09 ~ 10.17
Benvegna ⁵ (1998) ¹³⁾	1/13	7/24	6	0.26	0.04 ~ 1.92
IIHCSG (1998) ¹⁴⁾	8/49	18/97	5.8	0.88	0.41 ~ 1.88
Ikedo ⁵ (1998) ¹⁵⁾	10/94	51/219	7	0.46	0.24 ~ 0.86
Di Marco ⁵ (1999) ¹⁶⁾	2/109	6/193	7.8	0.59	0.12 ~ 2.87
Mazzella ⁵ (1999) ¹⁷⁾	1/33	2/31	7.2	0.47	0.04 ~ 4.92
Yuen ⁵ (2001) ¹⁸⁾	6/208	0/203	8.9	12.69	0.72 ~ 223.8
Tangkijvannich ⁵ (2001) ¹⁹⁾	2/67	9/72	5	0.24	0.05 ~ 1.07
Papatheodoridis ⁵ (2005) ²⁰⁾	17/209	15/195	6	1.06	0.54 ~ 2.06
Truong ⁵ (2005) ²¹⁾	1/27	0/35	6.5	3.86	0.16 ~ 91.2
Lin ⁵ (2007) ²²⁾	5/233	16/233	6.5	0.31	0.12 ~ 0.84
全体	59/1,292	131/1,450		0.66	0.48 ~ 0.89

表 2. B型慢性肝炎におけるラミブジンによる肝発癌抑制効果のメタ解析 (文献 10, 11 による)

Liaw ⁵ (2004) ²²⁾	17/436	16/215	2.7	0.52	0.27 ~ 1.02
Matsumoto ⁵ (2005) ²³⁾	4/377	50/377	2.7	0.08	0.03 ~ 0.22
Papatheodoridis ⁵ (2005) ²⁴⁾	5/201	15/195	3.8	0.32	0.12 ~ 0.87
Yuen ⁵ (2007) ²⁵⁾	1/142	3/124	3.8	0.29	0.03 ~ 2.76
Eun ⁵ (2007) ²⁶⁾	5/111	36/111	4.4	0.14	0.06 ~ 0.34
全体	32/1,267	120/1,022		0.22	0.10 ~ 0.50
サブ解析					
肝硬変	17/436	71/317		0.17	0.04 ~ 0.79
非肝硬変	9/488	31/386		0.21	0.10 ~ 0.47

の発生が抑制されることを示したものである。

日本で後ろ向きに多施設共同研究が行われ、患者背景をマッチさせたケースコントロール研究によって、77例のラミブジン投与例の肝発癌は年率0.4%であり、非投与のコントロール群の年率2.5%に比較して有意に肝癌を抑制していた²³⁾。

5つの論文のメタ解析ではラミブジン投与群1,267例の肝発癌は32例(2.5%)で、非投与群1,022例からの肝発癌は120例(11.7%)であり、ラミブジン投与によって発癌リスクが0.22に低下している^{10, 22~26)}(表2)。エンテカビルでも同様と考えられるが成績を集積する必要がある。

2. B型肝炎の再活性化

従来B型肝炎ウイルスに感染し急性肝炎を発症した後は、ウイルスは排除されたと考えられていた。しかし、最近一度感染したHBVは完全に排除されずcccDNA (covalently closed circular DNA)の形で肝細胞核内に残存していることが明らかになった。通常HBs抗原消失後にHBVの増殖は起こらないが免疫抑制下ではHBVの再増殖がおり肝炎が生じる。この肝炎を*de novo* B型肝炎と呼んでいる。

医療の進歩によって化学療法や免疫抑制療法

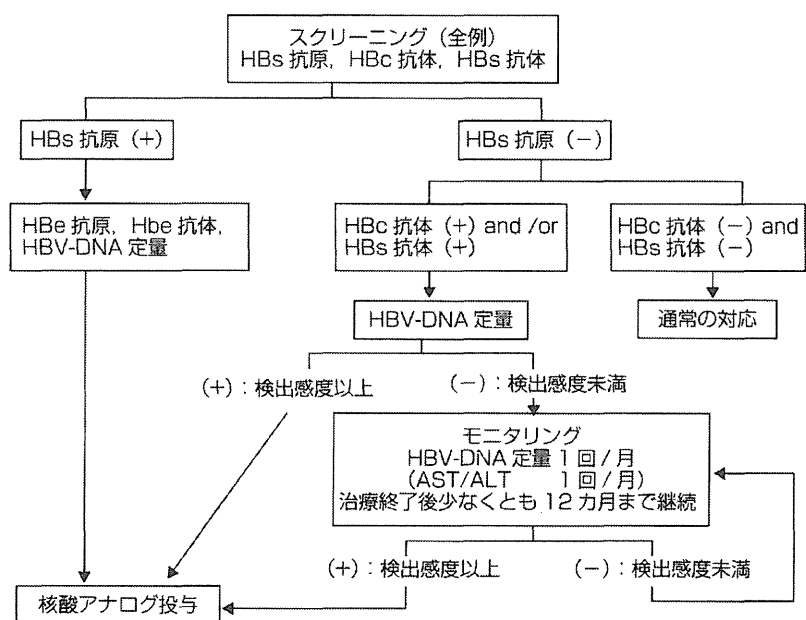


図 3. *de novo* B型肝炎の早期発見のためのガイドライン (文献 26 より引用)

を行う機会が増加し、この際に再活性化による B型肝炎が増える傾向がある。再活性化した場合に肝炎が重症化し致死的になる場合があり、多くの診療科で注意を要する。とくにリツキシマブを含む化学療法や移植で高頻度に見られる。生物製剤を投与する際にもみられるため、厚生労働省研究班によるガイドラインが示されている²⁶⁾(図 3)。悪性リンパ腫に対する R-CHOP療法後の*de novo* B型肝炎の予防では HBVDNA の定期測定による早期発見が有用であり、慢性関節リウマチや Crohn 病で生物製剤を投与する場合などでも、このガイドラインに準拠した対策が必要である。

HBキャリアでは HBV の再活性化予防には核酸アナログの投与が推奨されている。アメリカ肝臓学会が 2007 年に発表した B型肝炎のガイドラインでは化学療法や免疫抑制療法開始前より投与を開始し、治療中や終了後しばらくは継続して内服することが推奨されている。

3. C型肝炎の治療

1) わが国における現状

わが国では年間約 3 万 4 千人が肝癌で死亡しているが、原発性肝癌の 99% は肝細胞癌であり、肝細胞癌の 70~75% は C型肝炎が原因である。C型肝炎治療の最終目標は肝癌の抑止とそれによってもたらされる生命予後の改善であり、そのためにはインターフェロンを中心とした抗ウイルス療法による C型肝炎ウイルス (HCV) の排除が最も基本である。しかし、未だ HCV の持続感染を完全に制御することは困難で、さらにわが国では高齢者や線維化進展例が多いなど他の先進国にない特有の問題もあり²⁷⁾、肝発癌を抑止して疾患を完全に克服するには至っていない。わが国の現状を考慮した、発癌抑止をめざした C型肝炎対策が重要である。

2) これまでの標準治療と難治要因

わが国で C型肝炎の約 70% を占める HCV 遺伝子型 (ゲノタイプ) 1b は IFN に抵抗性を示し

ウイルス排除 (sustained virological response : SVR) を得ることが困難である。2004年からペグIFN・リバビリン併用療法が導入され、約50%の症例でSVRが得られるようになった。しかし、わが国におけるC型肝炎は、1) 高齢者が多い、2) 線維化進行例が多い、3) 発癌率が高いなど欧米と異なる特徴がみられ、また難治例における治療成績は満足できるものではない。最近、genome-wide association study (GWAS) を用いた宿主遺伝子の網羅的解析により、ヒト19番染色体上に存在しIFN λ をコードするIL (interleukin) 28B近傍の一遺伝子多型 (SNP) とペグIFN α ・リバビリン併用48週投与におけるウイルス学的治療効果との関連が明らかとなった^{28, 29)}。当院におけるIL28B SNP (rs8099917) のゲノタイプ頻度を検討すると、C型慢性肝疾患865例中メジャー・ホモ接合体TT(メジャー・タイプ)が73.1%で、ヘテロ接合体TGとマイナー・ホモ接合体GGのいわゆるマイナー・タイプはそれぞれ25.3%、1.6%であった。ゲノタイプ1b型の症例のペグIFNとリバビリン併用によるウイルス学的治療効果を検討すると、IL28Bメジャー・タイプでは54%がSVRとなるのに対して、IL28Bマイナー・タイプではわずか16%がSVRであり、反対に54%が治療中にHCV RNAの陰性化が得られないnon-virological responder (NVR)であった。IL28Bマイナー・タイプはNVRと極めて強い関連があった。

SVRに寄与する治療前因子を解析すると、宿主因子としてはIL28Bメジャー・タイプの他は男性、軽度線維化、LDL (low density lipoprotein) コレステロール非低値が、ウイルス側因子としては、ISDR (interferon sensitivity determining region) が非野生型や低ウイルス量が有意な独立因子であった。HCV RNAの陰性化が12週目以降に遅延する場合には、ペグIFN α とリバビリン併用治療を72週間に延長することが推奨される。

3) テラプレビルを含む3剤併用療法

わが国における臨床試験の結果でプロテアー

ゼ阻害薬であるテラプレビルとペグIFN α およびリバビリンとを3剤で24週間併用することにより、未治療例でSVR率73%と良好な成績が得られ、既治療例においては、前回再燃例ではSVR率は88%と高率であるが、前回無効 (NVR) 例では34%であった(図4)。従って、本3剤併用療法では、前治療におけるウイルス反応性が治療効果予測に極めて重要である。副作用としては貧血と皮疹が報告され、治療中の貧血モニターと薬剤投与量の調節やステロイド系外用薬および皮膚科医との連携が必須である。

Akutaらによるとテラプレビルを含む3剤併用療法の治療効果について、IL28B SNPとHCVコア変異やISDR変異などのウイルス因子も含めて解析し、IL28Bメジャー・タイプの症例ではHCVコア変異やISDR変異に関らずSVR率は84% (31/37)と高いが、IL28Bマイナー・タイプの症例では28% (8/29)と有意に低率で、とくにHCVコア変異を認める症例ではSVR率が12% (2/17)と極めて低率であった³⁰⁾。高齢者や線維化進展例の多いわが国においてIL28Bマイナー・タイプの症例に対しどのような治療戦略を立てていくか、ウイルス学的治療効果とともに副作用や今後の交差耐性の問題も含めて、対策を講じる必要がある。

4) 新薬開発の現状

テラプレビルはその構造上、基質であるペプチド類似の非環状型 (acyclic, linear type) に分類されるが、大環状型 (macrocylic type) のプロテアーゼ阻害薬も最近開発が進み、それぞれ治療効果や耐性変異プロファイル、副作用の特徴が異なり、今後の開発状況が注目される。その他、HCVのNS5Bを標的とするポリメラーゼ阻害薬、NS5Aを標的とするNS5A阻害薬、さらにペグIFN λ を用いた臨床試験も進行中であり、その有用性が期待される。特に、最近NS5A阻害薬とプロテアーゼ阻害薬の内服2剤によって、ゲノタイプ1b型では高いSVR率が報告され、近い将来内服薬のみでC型慢性肝炎が治癒することが

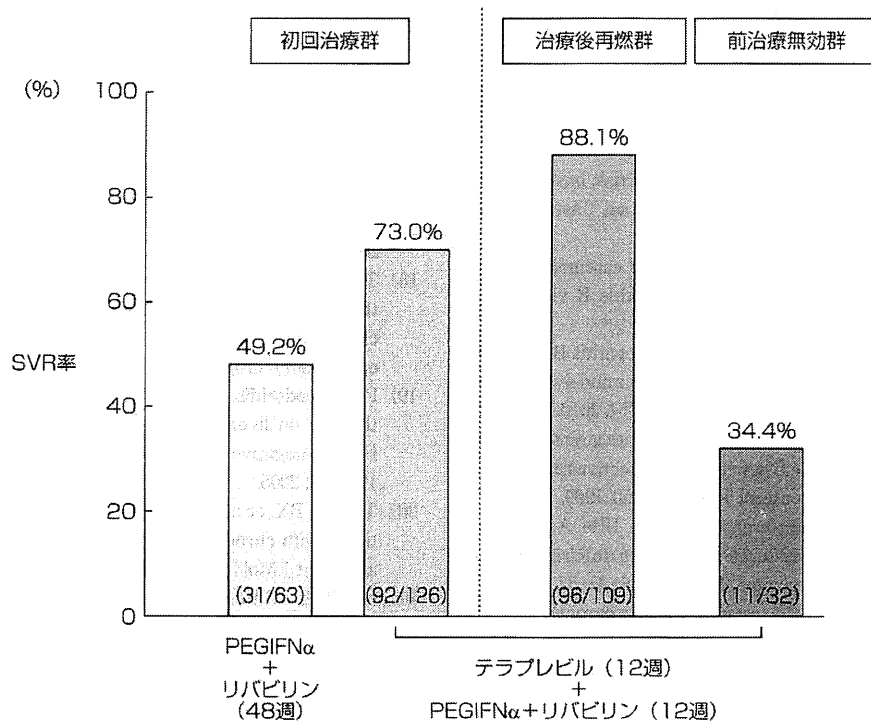


図4. ゲノタイプ1b型のC型慢性肝炎に対するテラプレビル・ペグIFNα2b・リバビリン併用治療によるSVR率 再治療では前回治療の再燃例では高いSVRが得られるがnon-responderではSVR率は34%である。

期待される。

5) 現状を考慮した対策

わが国のC型慢性肝炎における年齢別の発癌リスクを計算すると65歳以上で急激に発癌リスクが増大し、65歳以上の症例では、65歳未満に比し有意に累積発癌率が高かった。さらに、SVRにより得られる発癌抑止効果を65歳以上と65歳未満の症例で比較すると、いずれの年齢層においてもSVR例の方が非SVR例に比し有意に累積発癌率は低かったが、65歳以上の症例ではSVR例と非SVR例における累積発癌率の差が65歳未満と比較し小さかった²⁷⁾。従って、高齢者の多いわが国においては、その現状を考慮した発癌対策を講じる必要がある。われわれは非SVR例を対象に、IFN治療後のALT値とAFP (alpha-fetoprotein) 値で層別化してIFN後の累積発癌率

を検討した³¹⁾。IFN治療後のALT値やAFP値が低値の症例では、ウイルスが排除されていないにも関わらず有意に発癌率が低かった。従って、高齢者や線維化進展例およびIL28Bマイナー・タイプかつHCVコア変異例などで、SVRが相当得にくいと予測されても抗ウイルス療法の治療対象となり、ALTやAFPの低下をめざした何らかの抗ウイルス療法を積極的に行い発癌リスクを減らす努力が必要である。わが国では高齢者や線維化進展例が多いため、個々の症例における治療効果と発癌リスクを十分考慮したうえで、薬剤忍容性や薬剤耐性の問題も加味し、発癌抑止をめざしたより有効な対策を講じることが重要である。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：泉 並木；講演料

文 献

- 1) Yang HL, et al: Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 347: 168-174, 2002.
- 2) Iloeje UH, et al: Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 130: 678-686, 2006.
- 3) Chen CJ, et al: Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus level. *JAMA* 295: 65-73, 2006.
- 4) Chen JD, et al: Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology* 138: 1747-1754, 2010.
- 5) Mazzella G, et al: Long-term results with interferon therapy in chronic type B hepatitis: a prospective randomized trial. *Am J Gastroenterol* 94: 2246-2250, 1999.
- 6) Lin SM, et al: Interferon therapy in HBe Ag positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 46: 45-52, 2007.
- 7) Yang YF, et al: Interferon therapy in chronic hepatitis B reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma; a meta-analysis. *J Viral Hepat* 16: 265-271, 2009.
- 8) Miyake Y, et al: Meta-analysis; the effect of interferon on development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol* 44: 470-475, 2009.
- 9) Camma C, et al: Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis; an evidence-based approach. *J Hepatol* 34: 593-602, 2001.
- 10) Sung JJ, et al: Meta-analysis; treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 28: 1067-1077, 2008.
- 11) Fattovich G, et al: Long-term outcome of hepatitis B e antigen-positive patients with compensated cirrhosis treated with interferon alfa. *European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP)*. *Hepatology* 26: 1338-1342, 1997.
- 12) Krogsgaard K: The long-term effect of treatment with interferon-alpha 2a in chronic hepatitis B. The Long-term Follow-up Investigator Group. The European Study Group on Viral Hepatitis (EUROHEP), Executive Team on Anti-Viral Treatment. *J Viral Hepat* 5: 389-397, 1998.
- 13) Benvegnu L, et al: Retrospective analysis of the effect of interferon therapy on the clinical outcome of patients with viral cirrhosis. *Cancer* 83: 901-909, 1998.
- 14) IIHCSG: Effect of interferon-alpha on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *International Interferon-alpha Hepatocellular Carcinoma Study Group*. *Lancet* 351: 1535-1539, 1998.
- 15) Ikeda K, et al: Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by the hepatitis B virus; a pilot study. *Cancer* 82: 827-835, 1998.
- 16) Di Marco V, et al: The long-term course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 30: 257-264, 1999.
- 17) Yuen MF, et al: Long-term follow-up of interferon alfa treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B e antigen seroconversion and the development of cirrhosis-related complications. *Hepatology* 34: 139-145, 2001.
- 18) Tangkijvanich P, et al: Long-term effect of interferon therapy on incidence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Thai patients with chronic hepatitis B. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 32: 452-458, 2001.
- 19) Papatheodoridis GV, et al: Impact of interferon-alpha therapy on liver fibrosis progression in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 12: 199-206, 2005.
- 20) Truong BX, et al: Long-term follow-up of Japanese patients with chronic hepatitis B treated with interferon-alpha. *Int J Mol Med* 16: 279-284, 2005.
- 21) 黒崎雅之: B型肝炎ウイルスによる肝発癌抑制および再発防止に向けた抗ウイルス治療適応の変遷と国際比較. *The Liver Cancer Journal* 3: 41-48, 2011.
- 22) Liaw YF, et al: Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 351: 1521-1531, 2004.
- 23) Matsumoto A, et al: Efficacy of lamivudine for preventing hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: a multicenter retrospective study of 2795 patients. *Hepatology* 32: 173-184, 2005.
- 24) Yuen MF, et al: Long-term lamivudine therapy reduces the risk of long-term complications of chronic hepatitis B infection even in patients without advanced disease. *Antivir Ther* 12: 1295-1303, 2007.
- 25) Eun JR, et al: Risk assessment for the development of hepatocellular carcinoma; according to on-treatment viral response during long-term lamivudine therapy in hepatitis B virus-related liver disease. *J Hepatol* 53: 118-125, 2010.
- 26) 坪内博仁, 他: 免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策—厚労省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班副症肝炎分科会および「肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究」班合同報告. *肝臓* 50: 38-42, 2009.
- 27) Asahina Y, et al: Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52: 518-527, 2010.
- 28) Tanaka Y, et al: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 10: 1105-1109, 2009.
- 29) Ge D, et al: Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461: 399-

- 401, 2009.
- 30) Akuta N, et al : Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 52 : 421-429, 2010.
- 31) Asahina Y, et al : Association between IL28B gene variation and development of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 54 : S37, 2011.
-

特集II B型肝炎の抗ウイルス療法の進歩と耐性

B型慢性肝疾患に対する 核酸アナログ耐性例の検討*

中西 裕之**
黒崎 雅之**
泉 並木**

Key Words : lamivudine, entecavir, adefovir, hepatitis B virus (HBV), resistance

はじめに

B型肝炎ウイルス(HBV)持続感染者の一部は線維化の進展により肝硬変へと進行したり、経過中に肝細胞癌を発症したりする。11,893人を解析した大規模コホート研究により¹⁾, HBe抗原陽性者の発癌リスクはHBs抗原陰性のコントロールと比較し60.2倍であることが示された。一方で, HBs抗原陽性かつHBe抗原陰性者の発癌リスクはHBs抗原陰性者のコントロールと比較して9.6倍にとどまり, HBe抗原のセロコンバージョンにより発癌リスクは減少するものの, 依然として高い発癌リスクを有することが明らかとなった。従来, HBe抗原がセロコンバージョンしアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)値が正常化した非活動性キャリアは臨床的治癒と考えられていたが, HBe抗原陰性の非活動性キャリア1,932例を13.1年間観察したコホート研究によると, 肝細胞癌の発生リスクはHBs抗原陰性のコントロールと比較し4.6倍であることが報告された²⁾。すなわち, ALT値が正常であってもHBV持続感染者には肝癌発生のリスクがあり, 特にHBVDNA高値であることは線維化進展, 肝細胞癌と密接に関連する。台湾のREVEAL-HBV Studyグループは未治療のB型慢性

肝炎3,582例を11年間観察し, 肝硬変への進行リスク比が, HBVDNAが4~5 log copies/ml, 5~6 log copies/ml, および6 log copies/ml以上でそれぞれ2.5, 5.6, 6.5倍であり, HBVDNA量が多いと肝硬変への進行リスクが段階的に高くなることを報告³⁾した。また, 未治療のB型慢性肝炎3,653例を11.4年間観察し, 肝細胞癌発生のリスク比が, HBVDNAが4~5 log copies/ml, 5~6 log copies/ml, および6 log copies/ml以上でそれぞれ2.3, 6.6, 6.1倍であり, HBVDNA量が多くなるにしたがい, 段階的に発癌率が上昇することを報告した⁴⁾。このように, 高ウイルス量は肝硬変への進行や肝細胞癌発生にかかわる重要な因子である。HBe抗原, ALT値にかかわらず, HBVDNA量をモニターすることは, 肝硬変, 肝癌を予防する上で必要である。治療においては, HBVの逆転写酵素(DNAポリメラーゼ)阻害薬である核酸アナログ製剤が開発され, インターフェロン治療やステロイドリバウンドなど, 宿主の免疫賦活療法が中心であったB型肝炎の抗ウイルス療法は大きな変遷を遂げている。核酸アナログ製剤投与により, HBVの増殖が抑制され, HBe抗原のセロコンバージョンや, ALTの正常化, 肝発癌の抑制が得られることが報告されている⁵⁾⁶⁾。今後, わが国において, 抗ウイルス療法を長期にわたって行うことで, 抗ウイルス効果が持続し, 線維化の進展阻止, 肝発癌の抑止に寄与す

* Long-term efficacy of nucleoside analogues for hepatitis B virus-monoinfected patients.

** Hiroyuki NAKANISHI, M.D., Ph.D., Masayuki KUROSAKI, M.D., Ph.D. & Namiki IZUMI, M.D., Ph.D.: 武蔵野赤十字病院消化器科(〒180-8610 東京都武蔵野市境南町1-26-1); Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Musashino, Tokyo 180-8610, JAPAN

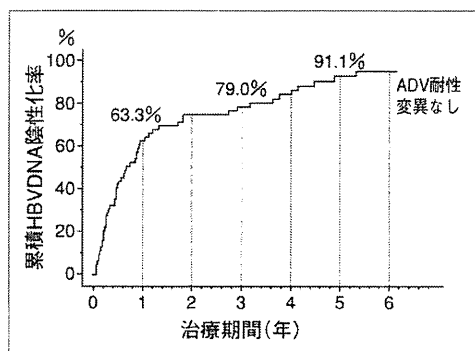


図1 LAM耐性例に対するLAM・ADV併用におけるHBVDNA陰性化率

るのか、それとも耐性ウイルス出現等の問題によって期待される治療効果が得られないのかは、重要な検討課題となる。本稿では、抗ウイルス療法を長期的に行った場合の治療効果、および耐性ウイルス出現とその対策の現状について概説する。

核酸アナログの治療効果

現在、わが国で使用可能な核酸アナログ製剤は、ラミブジン(LAM)、阿德ホビル(ADV)、エンテカビル(ETV)である。欧米では、これらに加え、telbivudineとtenofovirが使用可能である。また、韓国では、clevudineが使用可能である。これらの製剤は、HBVの逆転写酵素を阻害することにより強い抗ウイルス効果を示す。一般にETVとtenofovirがこれらの中では抗ウイルス効果が強く、耐性ウイルス出現が少ない。わが国では2000年11月から使用可能となったLAM治療では、高頻度にLAM耐性株⁷⁾が出現した。ADVはLAM耐性株に対する交叉耐性がないため、LAM耐性株に対する第一選択薬として導入された。わが国では、2004年にLAMとADVの併用療法、2008年からADV単独療法が使用可能になったが、現在、併用療法が基本とされている。LAM耐性例に対するLAM・ADV併用療法の治療成績は良好であり、HBVDNAの陰性化は12か月で69%、24か月で81%であり、ADV耐性変異出現は1.6%と低率である⁸⁾。さらに、LAM耐性例に対するADV単独によるADV耐性変異出現は1年で21%であるが、LAM・ADV併用療法では2年で1.6%と低

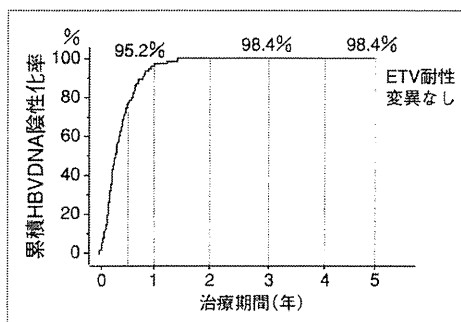


図2 核酸アナログnaïve症例に対するETV投与におけるHBVDNA陰性化率

率であった⁹⁾。これは、LAMとADVの耐性株がそれぞれADVとLAMに感受性があり、併用療法を行うことで耐性株出現を抑制しているものと推測される。当科において30か月以上核酸アナログ治療を行ったB型慢性肝疾患LAM耐性株出現例のうちADV追加投与となった66例の検討では、5年投与時HBV陰性化率は91.1%であり、ADV耐性変異は認めなかった(図1)。また、わが国で2006年に導入されたETVは、現在使用可能な核酸アナログ製剤の中で最も耐性株の出現頻度が低率であり、核酸アナログ初回投与例において、5年で1.2%と報告されている⁹⁾。わが国においても国内臨床試験の長期成績が報告され、96週時点でのHBVDNA陰性化は83~88%、ALT正常化は88~90.1%、セロコンバージョンは20~26%であった。3年後の肝生検で組織学的改善は100%、線維化の改善は57%であり、良好な治療成績が示された。3年間の耐性出現率は、全体では3.3%だが、十分量のETV(0.5mg)が投与された症例では1.7%であった¹⁰⁾。当科における核酸アナログ初回投与例に対するETV長期投与例での検討においても、5年HBVDNA陰性化率は98.4%を達成し、ETV耐性変異は認めなかった(図2)。しかし、LAM耐性株出現例に対するETV単独療法では、耐性変異の出現率が3年36%、5年51%、ウイルス学的breakthroughを伴う耐性変異は3年27%、5年43%と高率にETV耐性株が出現することが知られている⁹⁾。当科での検討でも、LAM耐性22症例にETVが投与され、うち7例31.8%にETV耐性を認めている。したがって、ETVは、初回核酸アナログ製剤の第一選択薬となったが、

LAM耐性株に対する単独療法は推奨されない。なお、ETV耐性株に対しては、ADVが有効であることが*in vitro*でも確認されており¹¹⁾、わが国ではADVとLAMの併用療法やADVとETVの併用療法が行われている。しかし、最終的に治療抵抗性を示す症例が存在する。当科での検討では、B型慢性肝疾患254例のうち、最終的に治療抵抗性を呈した症例は4例1.6%であった。多剤耐性例に対する治療について検討では、LAMおよびADV併用療法耐性例には、tenofovirの単独療法が有用であることが報告されている¹²⁾。TenofovirはADVに似た構造を持つ。ADV同様、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)とHBV両者に抗ウイルス活性を有し、HIVに対しては本邦でもすでに2004年4月から保険適用を得ている。米国では、2008年8月にB型肝炎の治療薬として認可されている。慢性B型肝炎患者を無作為にtenofovir投与群(300mg/日)とADV投与群(10mg/日)に分け、48週投与した際のHBVDNA400copies/ml以下達成率は、eAg陰性群でtenofovir投与例が93%であったのに対し、ADV投与例が63%、eAg陽性群でtenofovir投与例では76%であったのに対しADV投与例では13%であった。eAg陽性群ではALTの正常化はtenofovirが68%であったのに対し、ADV54%であった。安全性については差がなく、ADVよりもtenofovirが抗ウイルス効果において優れていることが明らかとなった¹³⁾。Tenofovir長期投与の報告では、144週投与でも耐性ウイルス出現がみられなかった¹⁴⁾。本邦でもtenofovir導入が望まれており、現在第III相臨床試験が進行中であり、今後の展開が期待される。

核酸アナログ治療継続の臨床的意義と今後の対策

これらの現状を踏まえ、厚生労働省研究班の定めたB型肝炎治療ガイドラインでは、現在、35歳以上の症例に対してETV治療が第一選択となっている。核酸アナログ治療を中止すると、B型肝炎ウイルス血症の再燃がみられ、肝炎が再燃し、場合によっては致命的となる症例も存在する¹⁵⁾¹⁶⁾。このため、現在では、核酸アナログ治療を中止することが困難となっている。しかし、治療中止後も長期にわたり肝機能が安定して過ごせる症例も存在する。長期投与による耐

性ウイルス出現の問題もあり、また、治療費も高額であることから、核酸アナログを中止または継続の基準作りが望まれる。核酸アナログ投与下では、逆転写酵素が阻害されているため、HBVDNA粒子の形成は抑制されている。しかしながら、感染肝細胞内に存在するcovalently closed circular DNA(cccDNA)はHBVの鋳型となり、半減期が長く、感染肝細胞の核内で維持される。肝細胞の半減期も30~100日と非常に長いため、cccDNAは安定して維持されやすい。核酸アナログは、cccDNAの合成は阻害できない。核酸アナログ治療中止時の再燃は、このcccDNAが鋳型となり、複製が再開するためと考えられる。核酸アナログ投与時には、cccDNA量とHBVDNA量の相関は失われるが、cccDNA量とB型肝炎ウイルスコア関連抗原(HBcrAg)は相関関係を保っていることが報告されており¹⁷⁾¹⁸⁾、これらのマーカーは核酸アナログ投与中の肝内HBVの増殖動態の指標となる。これは、核酸アナログ投与によりHBVDNAの粒子形成が阻害され、代わりにHBcrAgを含んだ不完全粒子が放出されるためである。また、HBs抗原も核酸アナログ投与によって直接的には産生が阻害されず、有用な指標となる可能性がある。当院での検討では、3年以上の長期核酸アナログ治療を行い、HBcrAg、HBs抗原を測定した174例について検討すると、HBsAg1.9logIU/ml未満かつHBcrAg3.0logIU/ml未満を達成した症例が7.5%あり、HBsAg陰性化まで達成した症例が1.1%あった。核酸アナログ治療においても、耐性ウイルスの出現を長期に抑えることができれば、治療中止が可能となる症例も今後増えてくるものと期待された。

文 献

- 1) Yang HI, Lu SN, Liaw YF, et al. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 168.
- 2) Chen JD, Yang HI, Iloeje UH, et al. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology* 2010; 138: 1747.
- 3) Iloeje UH, Yang HI, Su J, et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B vi-

- ral load. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 678.
- 4) Chen CJ, Yang HI, Su J, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006 ; 295 : 65.
 - 5) Lee HC, Suh DJ. Lamivudine therapy for decompensated liver cirrhosis related to hepatitis B virus infection. *Intervirology* 2003 ; 46 : 388.
 - 6) Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 1521.
 - 7) Lai CL, Dienstag J, Schiff E, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003 ; 36 : 687.
 - 8) 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.
 - 9) Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* 2009 ; 49 : 1503.
 - 10) Yokosuka O, Takaguchi K, Fujioka S, et al. Long-term use of entecavir in nucleoside-naive Japanese patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2010 ; 52 : 791.
 - 11) Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, et al. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol* 2007 ; 79 : 1811.
 - 12) van Bommel F, de Man RA, Wedemeyer H, et al. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. *Hepatology* 2010 ; 51 : 73.
 - 13) Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, et al. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 2442.
 - 14) Snow-Lampart A, Chappell B, Curtis M, et al. No resistance to tenofovir disoproxil fumarate detected after up to 144 weeks of therapy in patients monoinfected with chronic hepatitis B virus. *Hepatology* 2011 ; 53 : 763.
 - 15) 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.
 - 16) Nevens F, Main J, Honkoop P, et al. Lamivudine therapy for chronic hepatitis B : a six-month randomized dose-ranging study. *Gastroenterology* 1997 ; 113 : 1258.
 - 17) Suzuki F, Miyakoshi H, Kobayashi M, Kumada H. Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients. *J Med Virol* 2009 ; 81 : 27.
 - 18) Wong DK, Tanaka Y, Lai CL, et al. Hepatitis B virus core-related antigens as markers for monitoring chronic hepatitis B infection. *J Clin Microbiol* 2007 ; 45 : 3942.

* * *

Baseline Factors and Early Viral Response (Week 4) to Antiviral Therapy With Peginterferon and Ribavirin for Predicting Sustained Virologic Response in Patients Infected With Hepatitis C Virus Genotype 1: A Multicenter Study

Hidegori Toyoda,¹ Takashi Kumada,^{1*} Noritomo Shimada,² Koichi Takaguchi,³ Tatsuya Ide,⁴ Michio Sata,⁴ Hiroyuki Ginba,⁵ Kazuhiro Matsuyama,⁵ and Namiki Izumi⁶

¹Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, Ogaki, Japan

²Division of Gastroenterology and Hepatology, Shinmatsudo Central General Hospital, Matsudo, Japan

³Department of Internal Medicine, Kagawa Prefectural Central Hospital, Takamatsu, Japan

⁴Department of Digestive Disease Information and Research, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

⁵Department of Life Cycle Management, Roche Diagnostics Japan K.K., Tokyo, Japan

⁶Division of Gastroenterology and Hepatology, Musashino Red Cross Hospital, Musashino, Japan

Both baseline predictive factors and viral response at week 4 of therapy are reported to have high predictive ability for sustained virologic response to peginterferon and ribavirin combination therapy in patients with hepatitis C virus (HCV) genotype 1. However, it is not clear how these baseline variables and week 4 response should be combined to predict sustained virologic response. In this multicenter study, the authors investigated the impact of baseline predictive factors on the predictive value of week 4 viral response. Receiver-operating characteristic curve analyses were performed to evaluate the ability of week 4 reduction in HCV RNA levels to predict sustained virologic response in 293 Japanese patients infected with HCV genotype 1b. Analyses were performed in all patients and in patient subgroups stratified according to baseline variables. Overall, week 4 viral reduction demonstrates a high predictive ability for sustained virologic response. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value, and accuracy were higher than those of viral reduction at week 12. However, the best cut-off levels differ depending on the baseline factors and they were lower in patients with unfavorable baseline predictors. When patients had the TG/GG rs8099917 genotype, the best cut-off was markedly low with low PPV. Week 4 viral response can be a predictor of sustained virologic response in patients with HCV genotype 1 and is better than week 12 viral response. However, the cut-off

levels should be modified based on the baseline predictive variables. *J. Med. Virol.* 85:65–70, 2013. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: chronic hepatitis C; peginterferon and ribavirin; week 4 viral response; baseline predictive factors, genetic polymorphism near the *IL28B* gene

INTRODUCTION

Although the combination antiviral therapy with peginterferon (PEG-IFN) and ribavirin has increased markedly the rate of patients with a sustained virologic response, that is, the eradication of hepatitis C virus (HCV), only 50% of patients infected with HCV genotype 1 had achieved a sustained virologic response, approximately. Several studies reported that early HCV viral dynamics during therapy have a high

This study was supported by Roche Diagnostics Japan, K.K. There is no competing interest on this study. The employment status of H. Ginba and K. Matsuyama did not influence the data and the interpretation of the study.

*Correspondence to: Takashi Kumada, Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, 4-86 Minaminokawa, Ogaki, Gifu 503-8502, Japan.
E-mail: takashi.kumada@gmail.com

Accepted 30 July 2012

DOI 10.1002/jmv.23428

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

predictive value for a sustained virologic response in HCV genotype 1-infected patients. Previous studies reported that the response of HCV during combination therapy, that is, the changes in serum HCV RNA levels after starting therapy, has been shown to be an important predictor of the treatment outcome [Zeuzem et al., 2001; Buti et al., 2002; Berg et al., 2006]. Several recent reports have emphasized the importance of evaluating the viral dynamics at 4 weeks after starting therapy to predict a sustained virologic response. A rapid virologic response, in which serum HCV RNA is undetectable at 4 weeks after starting therapy, has been a strong predictive factor of a sustained virologic response reportedly [Martinez-Bauer et al., 2006; Poordad et al., 2008; Martinot-Peignoux et al., 2009; de Segadas-Soares et al., 2009]. In addition to a rapid virologic response, reduced serum HCV RNA levels at 4 weeks after starting therapy has also been reported to have a strong predictive value for the likelihood of achieving sustained virologic response to PEG-IFN and ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1 [Yu et al., 2007; Huang et al., 2010; Toyoda et al., 2011; Marcellin et al., 2012]. These studies suggested that a reduction in HCV RNA levels at week 4 is closely associated with the probability of achieving sustained virologic response.

Aside from early viral response to therapy, several baseline host and viral factors are associated with treatment outcome. Genetic polymorphism near the *IL28B* gene (rs12979860 or rs8099917) is the strongest baseline factor associated with treatment outcome in patients with HCV genotype 1 reportedly [Ge et al., 2009; Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009; McCarthy et al., 2010; Rauch et al., 2010]. In addition, studies from Japan have reported that amino acid substitutions at residue 70 of the HCV core region and amino acids 2,209–2,248 of the NS5A region of HCV (i.e., interferon sensitivity-determining region, ISDR) are viral factors associated with treatment outcome in patients with HCV genotype 1b [Enomoto et al., 1996; Akuta et al., 2005, 2007a; Donlin et al., 2007; Maekawa and Enomoto, 2009; Hayes et al., 2011]. Given these various predictors for a sustained virologic response, that is, week 4 viral response and baseline variables, how should they be combined to predict treatment outcome more precisely? In the present study, the authors investigated how to incorporate week 4 viral response to PEG-IFN and ribavirin combination therapy with baseline predictive factors to predict a sustained virologic response.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Analyses

In this multicenter study, 682 patients who underwent PEG-IFN alpha-2b and ribavirin combination therapy in a standard treatment regimen at one of the participating institutions, (Musashino Red Cross Hospital, Kurume University Hospital, Shin-Matsudo

Central General Hospital, Kagawa Prefectural Central Hospital, and Ogaki Municipal Hospital) between December 2004 and January 2010 were initially included into the retrospective analyses. All patients were infected with HCV genotype 1b; patients with HCV genotype 1a are usually not found in the Japanese general population. Pretreatment HCV RNA levels were $\geq 5.0 \log_{10}$ IU/ml, based on a quantitative real-time PCR-based method (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test; Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA; lower limit of quantification, $1.7 \log_{10}$ IU/ml; lower limit of detection, $1.0 \log_{10}$ IU/ml) [Colucci et al., 2007; Pittaluga et al., 2008], because the use of ribavirin along with PEG-IFN is not approved by Japanese National Medical Insurance System for patients with pretreatment HCV RNA levels $< 5.0 \log_{10}$ IU/ml. No patients had co-infection with hepatitis B virus or human immunodeficiency virus. All patients had 100% medication adherence for both PEG-IFN and ribavirin during the initial 4 weeks of therapy and 80% or more throughout the treatment period. Among these 682 patients, three baseline factors, genetic polymorphism near the *IL28B* gene, amino acid substitution at residue 70 of the HCV core region, and ISDR sequence had been measured prior to treatment in 405 patients. We excluded 112 of these 405 patients with extended treatment duration up to 72 weeks because the extension of treatment duration might influence outcomes, leaving 293 patients who underwent 48-week standard regimen included in the final sample (Fig. 1).

Receiver-operating characteristic (ROC) analyses were performed to evaluate the value of week 4 reduction in HCV RNA levels in predicting sustained virologic response and an area under the ROC curve (AUROC) was generated. Best cut-off levels were determined based on the sensitivity and specificity. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy were also calculated using these cut-off levels. Analyses were performed for all patients and subgroups according to baseline variables. The same analyses were performed on the reduction in HCV RNA levels at week 12 after starting therapy.

The study protocol was in compliance with the Helsinki Declaration and was approved by the ethics committee of each participating institution.

Measurements of Serum HCV RNA Levels, Amino Acid Substitution at Residue 70 in the HCV Core, Amino Acid Sequence of ISDR, and Genetic Polymorphism Near the *IL28B* Gene

After each patient gave informed consent, serum samples were obtained during the patient's regular hospital visits just prior to beginning treatment, every 4 weeks during the treatment period, and during the 24-week follow-up period after treatment. Serum samples were stored at -80°C until they were analyzed. HCV RNA levels were measured using a quantitative

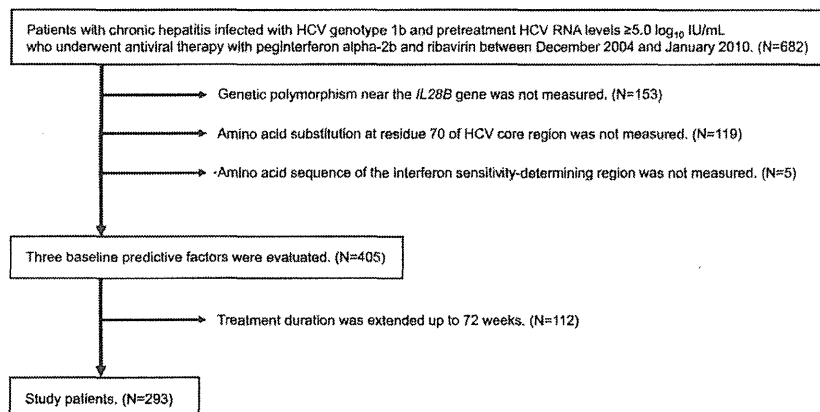


Fig. 1. Schematic representation of the study patients.

real-time PCR-based method (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test). The reductions in HCV RNA 4 and 12 weeks after starting therapy were calculated based on the pretreatment HCV RNA levels. When calculating the reduction in HCV RNA levels, HCV RNA concentration was defined as zero when HCV RNA was undetectable (i.e., rapid virologic response at week 4 and complete early virologic response at week 12).

Amino acid 70 of the HCV core region and the amino acid sequence of the ISDR were analyzed by direct nucleotide sequencing of each region as described previously [Enomoto et al., 1996; Akuta et al., 2007b]. The following PCR primer pairs were used for direct sequencing of the HCV core region:

5'-GCCATAGTGGTCTGCGGAAC-3' (outer, sense primer), 5'-GGAGCAGTCCTTCGTGACATG-3' (outer, antisense primer), 5'-GCTAGCCGAGTAGTGT-3' (inner, sense primer), and 5'-GGAGCAGTCCTTCGTGACATG-3' (inner, antisense primer). The following PCR primers were used for direct sequencing of ISDR: 5'-TTCCACTACGTGACGGGCAT-3' (outer, sense primer), 5'-CCCCTCCATGTGTAGGACAT-3' (outer, antisense primer), 5'-GGGTACAGCTCCCTGTGAGCC-3' (inner, sense primer), and 5'-GAGGGTTGTAATCCGGCGTGC-3' (inner, antisense primer). When evaluating the ISDR, HCV was defined as wild-type when there were zero or one amino acid substitutions in residues 2,209–2,248 as compared with the HCV-J strain [Kato et al., 1990], and as non-wild-type when there was more than one substitution.

Genotyping of rs8099917 polymorphisms near the *IL28B* gene was performed using the TaqMan SNP assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's guidelines. A pre-designed and functionally tested probe was used for rs8099917 (C_11710096_10, Applied Biosystems). Genetic polymorphism of rs8099917 reportedly corresponds to

rs12979860 in more than 99% of individuals of Japanese ethnicity [Tanaka et al., 2010]. The TT genotype of rs8099917 corresponds to the CC genotype of rs12979860, the GG genotype of rs8099917 corresponds to the TT genotype of rs12979860, and the TG heterozygous genotype of rs8099917 corresponds to the CT of rs12979860.

RESULTS

Patients Characteristics and Baseline Variables

Table I summarizes patient characteristics. The polymorphism of rs8099917 was TT genotype in 204 patients (69.6%). Amino acid substitution at residue 70 was arginine in 200 patients (68.3%). HCV-ISDR was non-wild-type in 78 patients (26.6%). All these variables (TT genotype of rs8099917, arginine at residue 70, and non-wild-type ISDR) were reportedly associated with favorable response to therapy.

As a final outcome, 113 patients (38.6%) achieved sustained virologic response. Sensitivity, specificity, PPV, NPV, and accuracy were 97%, 48%, 54%, 97%, and 67%, respectively, according to genotypes of rs8099917 near the *IL28B* gene. They were 85%, 42%, 48%, 82%, and 59%, respectively, according to amino acid substitutions at residue 70 in the HCV core region, and 43%, 84%, 63%, 70%, and 78%, respectively, according to ISDR of HCV NS5A region.

Association Between Week 4 Viral Reduction and Treatment Outcome Based on Baseline Predictive Factors

Table II shows the predictive value of a reduction in serum HCV RNA levels at week 4 of therapy in all patients and based on each baseline predictive variable. Week 4 viral reduction demonstrates a high predictive ability for a sustained virologic response with

TABLE I. Characteristics of Study Patients

Age (years), median (range)	60 (20–80)
Sex (male/female) (%)	150 (51.2)/143 (48.8)
BMI, median (range)	22.6 (15.8–33.3)
Prior treatment for HCV (no/yes) (%)	201 (68.6)/92 (31.4)
Initial dose of PEG-IFN (μg), median (range)	80.0 (40.0–150.0)
Initial dose of ribavirin (mg), median (range)	600 (200–1,000)
Pretreatment HCV RNA levels (\log_{10} IU/ml), median (range)	6.1 (5.0–7.4)
Platelet count ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	159 (43–373)
Hemoglobin (g/dl)	13.9 (8.6–18.1)
Neutrophil count (μl^{-1})	2,430 (4,670–7,480)
Alanine aminotransferase (IU/L)	49 (10–485)
Genetic polymorphisms of rs8099917 (TT/TG or GG) (%)	204 (69.6)/89 (30.4)
Amino acid at residue 70 of HCV core (arginine/glutamine or histidine) (%)	200 (68.3)/93 (31.7)
Amino acid sequence of ISDR (non-wild-type/wild-type) (%)	78 (26.6)/215 (73.4)

(N = 293).

BMI, body mass index; HCV, hepatitis C virus; PEG-IFN, peginterferon; ISDR, interferon sensitivity-determining region.

a high AUROC in all patients, in which sensitivity, specificity, PPV, NPV, and accuracy were more than 80%. The best cut-off for the prediction was 3.1-log_{10} reduction. When patients were stratified according to baseline predictive factors, AUROC remained above 0.85, indicating retention of high predictive ability. However, the best cut-off levels differ depending on baseline factors, and they were lower in patients with unfavorable baseline predictors (TG/GG genotype of rs8099917 near the *IL28B* gene, glutamine/histidine at residue 70 of the HCV core region, and wild-type of ISDR). Especially, when patients had the TG/GG rs8099917 genotype, the calculated best cut-off level was markedly lower than that of patients with the TT genotype. Sensitivity, specificity, PPV, NPV, and accuracy were more than 70% in all patient subgroups, except for patients with the TG/GG genotype in whom PPV was only 10%.

Association Between Week 12 Viral Reduction and Treatment Outcome Based on Baseline Predictive Factors

Table III shows the predictive value of a reduction in serum HCV RNA levels at week 12 of therapy in all patients and based on each baseline predictive variable. The predictive ability of week 12 viral reduction

for sustained virologic response was decreased in comparison to that of week 4 with a low AUROC in all patients. The specificity, PPV, and accuracy of the prediction at week 12 were also lower than those at week 4. The best cut-off levels increased to 5.0-log_{10} reduction. When patients were stratified according to the genetic polymorphisms of rs8099917 near the *IL28B* gene and according to amino acid substitutions at residue 70 of the HCV core region, the differences of the best cut-off levels based on these baseline factors were less marked than those at week 4, although the best cut-off levels remained lower in patients with unfavorable baseline predictors. The difference of best cut-off levels between patients with TT genotype and with TG/GG genotype of rs8099917 also decreased, but PPV in patients with TG/GG genotype remained low (21%). In contrast, the difference in the best cut-off levels increased when patients were stratified according to amino acid sequences in ISDR. The best cut-off level of the reduction in HCV RNA levels at week 12 for predicting sustained virologic response was higher in patients with HCV of wild-type ISDR, an unfavorable baseline variable, than in patients with HCV of favorable non-wild-type ISDR, which was inverse to the evaluation with week 4 viral reduction in which the cut-off level was higher in patients with HCV of non-wild-type ISDR.

TABLE II. AUROC, Best Cut-Off Level, Sensitivity, Specificity, PPV, NPV, and Accuracy of the Reduction in Serum HCV RNA Levels 4 Weeks After Starting PEG-IFN and Ribavirin Combination Therapy From Pretreatment Levels for Predicting Sustained Virologic Response

	N	AUROC	Best cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
Overall	293	0.92746	$3.1 \log_{10}$	88	87	81	92	87
<i>IL28B</i> -TT	204	0.88353	$3.2 \log_{10}$	87	78	82	84	83
<i>IL28B</i> -TG or GG	89	0.84302	$1.1 \log_{10}$	100	69	10	100	70
Core 70-R	200	0.91023	$3.2 \log_{10}$	86	83	82	87	85
Core 70-Q or H	93	0.94350	$2.8 \log_{10}$	88	93	75	97	92
ISDR-non-wild type	78	0.93455	$3.0 \log_{10}$	90	90	94	84	90
ISDR-wild type	215	0.92654	$2.9 \log_{10}$	92	84	71	96	87

AUROC, area under the receiver-operating characteristics curve; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; HCV, hepatitis C virus; PEG-IFN, peginterferon; R, arginine; Q, glutamine; H, histidine; ISDR, interferon sensitivity-determining region.

J. Med. Virol. DOI 10.1002/jmv

TABLE III. AUROC, Best Cut-Off Level, Sensitivity, Specificity, PPV, NPV, and Accuracy of the Reduction in Serum HCV RNA Levels 12 Weeks After Starting PEG-IFN and Ribavirin Combination Therapy From Pretreatment Levels for Predicting Sustained Virologic Response

	N	AUROC	Best cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
Overall	293	0.86907	5.0 log ₁₀	88	73	67	91	79
<i>IL28B</i> -TT	204	0.79216	5.11 log ₁₀	81	61	70	73	71
<i>IL28B</i> -TG or GG	89	0.92829	4.6 log ₁₀	100	87	21	100	88
Core 70-R	200	0.81791	5.0 log ₁₀	88	63	69	86	75
Core 70-Q or H	93	0.94272	4.9 log ₁₀	100	84	59	100	87
ISDR-non-wild type	78	0.87298	5.0 log ₁₀	88	79	88	79	85
ISDR-wild type	215	0.89572	5.4 log ₁₀	84	79	63	92	81

AUROC, area under the receiver-operating characteristics curve; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; HCV, hepatitis C virus; PEG-IFN, peginterferon; R, arginine; Q, glutamine; H, histidine; ISDR, interferon sensitivity-determining region.

DISCUSSION

This study was conducted to confirm the predictive value of week 4 viral dynamics of HCV for predicting sustained virologic response to the combination therapy with PEG-IFN and ribavirin in patients infected with HCV genotype 1 and with pretreatment HCV RNA levels of ≥ 5.0 log₁₀ IU/ml in a large multicenter study of Japan. The comparison of the predictability for sustained virologic response between week 4 and week 12 viral reductions revealed the higher predictive ability of week 4 viral response. In a recent study, Marcellin et al., [2012] suggested that a ≥ 3 log₁₀ reduction in HCV RNA levels at week 4 of PEG-IFN and ribavirin combination therapy is a reliable factor for predicting sustained virologic response in patients with HCV genotype 1. Our current results are consistent with their analysis for patients with HCV genotype 1b and those with pretreatment HCV RNA levels ≥ 5.0 log₁₀ IU/ml overall. The reduction in HCV RNA levels at week 4 appears to be a good and reliable predictor for a sustained virologic response. Although week 12 viral response (i.e., early virologic response) has been used as a pivotal decision criterion to extend treatment duration or to discontinue treatment, the predictive value is lower when the reduction in HCV RNA levels is compared to week 4 viral response.

When patients were stratified based on baseline predictive factors, however, the best cut-off levels for sustained virologic response were not constant. The cut-off levels decreased in patients with unfavorable baseline factors, that is, TG/GG genotype of rs8099917, glutamine/histidine at residue 70 of the HCV core region, and wild-type sequence of ISDR, indicating that the reduction in HCV RNA occurs slowly in patients with these unfavorable baseline variables. Conversely and paradoxically, the results may indicate that one can expect sustained virologic response in patients with a smaller reduction in HCV RNA levels at week 4 if they have unfavorable baseline variables.

When predictive value was evaluated using week 12 viral reduction, the best cut-off levels remained lower in patients with unfavorable TG/GG rs8099917 genotype and patients with HCV of unfavorable

glutamine/histidine at residue 70 of the HCV core region. In contrast, the best cut-off level was higher in patients with HCV of unfavorable wild-type ISDR. Previous studies reported the association between the genetic polymorphisms near the *IL28B* gene (rs12979860 and rs8099917) and amino acid substitution at residue 70 of HCV core region [Abe et al., 2010; Kobayashi et al., 2010], whereas no associations were reported between these two variables and ISDR mutation. This might explain the difference in the relationship of early viral response during therapy between with two baseline predictive factors, *IL28B* genetic polymorphisms and amino acid substitution of HCV core region and with ISDR mutation.

The calculated PPV was markedly low in patients with the unfavorable TG/GG genotype of rs8099917 (CT/TT genotype of rs12979860) both by the evaluations at weeks 4 and 12 viral responses. Therefore, it appears to be difficult to identify patients in this subgroup who are likely to achieve a sustained virologic response by their week 4 viral response, although week 4 viral response can be a factor used to identify patients with a high likelihood of achieving sustained virologic response in other subgroups.

In conclusion, week 4 viral response can be a predictor of sustained virologic response in patients with HCV genotype 1. However, the cut-off levels should be modified based on baseline host and viral predictive variables. In addition, week 4 viral response is not predictive in patients with unfavorable genotype of genetic polymorphism near the *IL28B* gene.

REFERENCES

- Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. 2010. Common variation of *IL28B* affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol* 53: 439–443.
- Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Watahiki S, Sato J, Matsuda M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. 2005. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 48:372–380.
- Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K,

- Kumada H. 2007a. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: Amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 46:403–410.
- Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H. 2007b. Prediction of response to pegylated interferon and ribavirin in hepatitis C by polymorphisms in the viral core protein and very early dynamics of viremia. *Intervirology* 50:361–368.
- Berg T, von Wagner M, Nasser S, Sarrazin C, Heintges T, Gerlach T, Buggisch P, Goeschel T, Rasenack J, Pape GR, Schmidt WE, Kallinowski B, Klinker H, Spengler U, Martus P, Alshuth U, Zeuzem S. 2006. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: Comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 130:1086–1097.
- Buti M, Sanchez-Avila F, Lurie Y, Stalgis C, Valdes A, Martell M, Esteban R. 2002. Viral kinetics in genotype 1 chronic hepatitis C patients during therapy with 2 different doses of peginterferon alfa-2b plus ribavirin. *Hepatology* 35:930–936.
- Colucci G, Ferguson J, Harkleroad C, Lee S, Romo D, Soviero S, Thompson J, Velez M, Wang A, Miyahara Y, Young S, Sarrazin C. 2007. Improved COBAS TaqMan hepatitis C virus test (version 2.0) for use with the High Pure system: Enhanced genotype inclusivity and performance characteristics in a multisite study. *J Clin Microbiol* 45:3595–3600.
- de Segadas-Souares JA, Villala-Nogueira CA, Perez RM, Nabuco LC, Brandao-Mello CE, Coelho HSM. 2009. Is the rapid virologic response a positive predictive factor of sustained virologic response in all pretreatment status genotype 1 hepatitis C patients treated with peginterferon- α 2b and ribavirin? *J Clin Gastroenterol* 43:362–366.
- Doulin MJ, Cannon NA, Yao E, Li J, Wahed A, Taylor MW, Belle SH, Di Bisceglie AM, Aurora R, Tavis JE, Virahep-C Study Group. 2007. Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy. *J Virol* 2007; 81:8211–8224.
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. 1996. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334:77–81.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399–401.
- Hayes NC, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. 2011. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut* 60:261–267.
- Huang CF, Yang JF, Huang JF, Dai CY, Chiu CF, Hou NJ, Hsieh MY, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Chang WY, Chuang WL, Yu ML. 2010. Early identification of achieving a sustained virological response in chronic hepatitis C patients without a rapid virological response. *J Gastroenterol Hepatol* 25:758–765.
- Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. 1990. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9524–9528.
- Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Sezaki H, Yatsuji H, Hosaka T, Kobayashi M, Kawamura Y, Hirakawa M, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Iwasaki S, Watahiki S, Nakamura Y, Chayama K, Kumada H. 2010. Relationship between SNPs in the IL28B region and amino acid substitutions in HCV core region in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Kanzo* 51:322–323; [in Japanese with English abstract].
- Maekawa S, Enomoto N. 2009. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 44:1009–1015.
- Marcellin P, Reau N, Ferenci P, Hadziyannis S, Messinger D, Tatsch F, Jensen D. 2012. Refined prediction of week 12 response and SVR based on week 4 response in HCV genotype 1 patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD) and ribavirin. *J Hepatol* 56:1276–1282.
- Martinez-Bauer E, Crespo J, Romero-Gomez M, Moreno-Otero R, Sola R, Tesei N, Pons F, Forn X, Sanchez-Tapias JM. 2006. Development and validation of two models for early prediction of response to therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 43:72–80.
- Martinot-Peignoux M, Maylin S, Moucari R, Ripault M-P, Boyer N, Cardoso A-C, Guilly M, Castelnau C, Pouteau M, Stern C, Aupeyin A, Bedossa P, Asselah T, Marcellin P. 2009. Virological response at 4 weeks to predict outcome of hepatitis C treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther* 14:501–511.
- McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, Tillmann HL, Muir AJ, McHutchison JG. 2010. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 138:2307–2314.
- Pittaluga F, Alice T, Abate ML, Ciancio A, Cerutti F, Varetto S, Colucci G, Smedile A, Ghisetti V. 2008. Clinical evaluation of the COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan for HCV RNA quantitation in comparison with the branched-DNA assay. *J Med Virol* 80:254–260.
- Poordad F, Reddy KR, Martin P. 2008. Rapid virologic response: A new milestone in the management of chronic hepatitis C. *Clin Infect Dis* 46:78–84.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battagay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY, Swiss Hepatitis C Cohort Study; Swiss HIV Cohort Study. 2010. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: A genome-wide association study. *Gastroenterology* 138:1338–1345.
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. 2009. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41:1100–1104.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105–1109.
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Tokunaga K, Mizokami M. 2010. λ -interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 40:449–460.
- Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Arakawa T, Fujimori M, Niinomi T, Ando N, Yasuda S, Sakai K, Kimura J. 2011. High ability to predict the treatment outcome of peginterferon and ribavirin combination therapy based on the reduction in HCV RNA levels at 4 weeks after starting therapy and amino acid substitutions in hepatitis C virus in patients infected with HCV genotype 1b. *J Gastroenterol* 46:501–509.
- Yu JW, Wang GQ, Sun LJ, Li XG, Li SC. 2007. Predictive value of rapid virological response and early virological response on sustained virological response in HCV patients treated with pegylated interferon α -2a and ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 22:832–836.
- Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Neumann AU, Modi M, Colucci G, Roth WK. 2001. Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha2a. *Gastroenterology* 120:1438–1447.