

Figure 3. 1b型のHCVのうち、ISDR変異数0ないし1個の症例での、ウイルス反応別の各アミノ酸部位での有意差をみた。HCVウイルス量が1log未満の低下しか得られなかった平坦反応（flat response）群と2log以上減少する急峻反応（steep response）群の全塩基配列の比較で、統計学的有意差がみられたのはコア70番のアミノ酸のみであった。

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

コア70番アミノ酸変異の有用性が生じてきた。実際のSVR率はISDR変異数0ないし1個の症例で、コア70番アミノ酸がRの場合は58%であり、QないしはHの場合は11%であった（ $p=0.0006$ ）。したがって、1b型に対する48週間のペグインターフェロン+リバビリン併用療法において、治療効果予測に最も重要なものはISDR変異数であり、2個以上であれば高いSVR率が期待できるものの、ISDR変異数0ないし1個の場合には、コア70番アミノ酸がRの場合にのみ高いSVR率が期待できることが示された。したがって、治療効果予測には、まずISDRを測定し、変異数が0ないし1個の場合にはコア70番のアミノ酸変異を測定することで詳細な治療効果予測が可能であると考えられる。

VI V3領域とIRRDR

ISDRとコアアミノ酸以外にも、治療効果を規定するウイルス変異としては、V3 region (NS5A

Table 1. 多変量ロジステック回帰分析

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

(n = 152)

1b 型の HCV のうち、ISDR 変異数 0 ないし 1 個の症例に限って、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法 48 週間の治療成績を、多変量解析すると、有意な因子としてコア 70 番のみであった。

aa2356-2379) を含む NS5A aa2334-2379 領域が、IFN/RBV 抵抗性領域 (IRRDR) として、報告されている。すなわち、1b 型 HCV 例のペグインターフェロン+リバビリン併用療法施行 45 例の比較検討より、この領域に 6 個以上のアミノ酸変異がみられた場合に高い SVR 率が期待され、6 個以上の変異では 89% の SVR が得られたと報告されている¹³⁾。この変異と ISDR やコアアミノ酸変異との関連は明らかではなく今後解析の結果が待たれるところである。

VII 遺伝子解析を応用した個別化医療の可能性と今後の展望

C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療は、厚生労働省の治療ガイドラインにも示されているように、遺伝子型が 2a ないしは 2b 型であればインターフェロン単独療法でもある程度効果が期待できるが、ウイルス量が多い場合は、ペグインターフェロン+リバビリン併用療法が望ましい。さらに、1b 型でも ISDR 変異数が 4 個以上あれば、単独療法でも治癒可能であるし、2 個以上あればペグインターフェロン+リバビリン療法 48 週間の治療で SVR が期待できる。また ISDR 変異数が 0 ないし 1 で、かつコア 70 番のアミノ酸が変異型の Q であれば治療効果が期待できない。

これら難治例に対しては、治療期間の延長により SVR 率の改善の可能性はある。Berg らは、治療開始 12 週までにウイルス陰性化が得られないものの 24 週までにウイルスが消失した症例では、治療期間を 48 週から 72 週に延長すること

で、SVR 率が 17% から 29% に改善したと報告している¹⁹⁾し、Sanchez-Tapias らは 4 週までにウイルス陰性化しかなかった症例を 72 週まで治療延長した場合に SVR 率が 28% から 44% に改善したことを報告している²⁰⁾。われわれの検討でも、上述の難治例では治療期間延長により、治療効果の改善がみられている。とくに、ISDR 変異数 0 ないし 1 個でコア 70 番アミノ酸が Q の症例では 48 週間のペグインターフェロン+リバビリン併用療法の SVR 率は 11% であったが、治療開始 12~24 週にウイルスが陰性化した症例を 72 週間治療すると SVR 率は 40% に向上した。したがって、治療前のウイルス変異に加え、治療開始からのウイルス陰性化時期を考慮することで、最大限の治療効果を得ることができる可能性がある。

しかし、ISDR とコアアミノ酸変異を加えた遺伝子変異を検討しても、宿主因子である性別、年齢、肝線維化・脂肪化、初回・再治療、前治療の効果なども考慮しなければ、一律に治療方針を決定することはできない。われわれの検討でも、ウイルス側因子から難治であると想定されても治癒した症例では、若年・男性・肝線維化が軽度である症例が多く含まれ、ウイルス側因子から SVR が期待されながら治療に失敗した例では、高齢、線維化進展例などが多い。現在までに得られた ISDR とコアアミノ酸変異からみた治療成績を示す (Figure 4) が、このほかにも、治療効果と関連すると考えられる因子は存在し、仮に 10 個の因子が関連すると仮定しても $2^{10} = 1024$ の組み合わせ

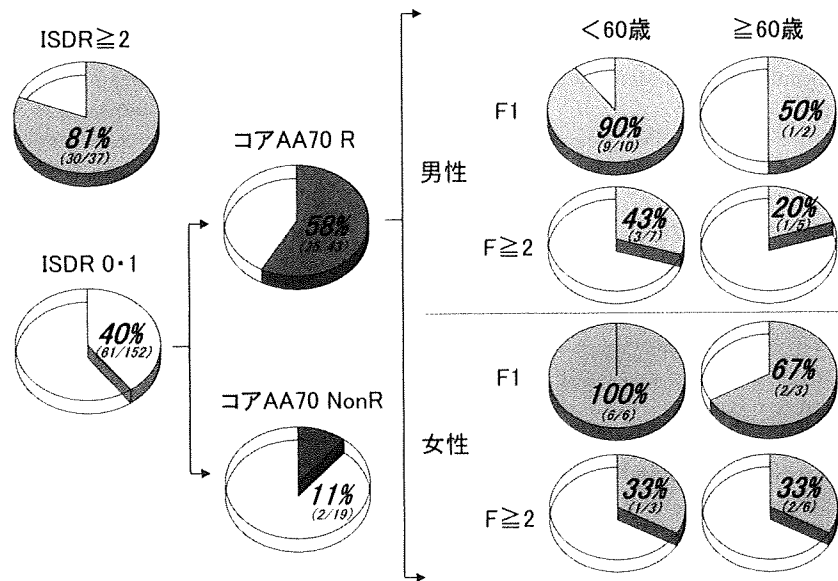


Figure 4. 1bかつ高ウイルス量症例に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法48週の治療成績を検討した。まず、統計学的に最も強力な因子であるISDR変異数により2個以上、0ないし1個に分類し、ISDR変異数0ないし1個の症例ではさらにコア70番のアミノ酸により分類した。さらにコア70番アミノ酸がRの症例では、統計学的に有意な宿主因子である、年齢と肝線維化ごとの治療成績を男女別に示した。

が存在することになる²¹⁾。このうち治療効果予測に最も重要なものは、遺伝子型やISDRを含めたウイルス側因子であることはいままでの間、今後はこれら因子を組み合わせた詳細な治療効果予測によって、近い将来の、いわゆる個別化医療が可能になるものと思われる。また、最近、治療効果を予測する方法として、仮説を検証する従来の統計解析手法とは全く異なる「データマイニング手法」を用いて治療効果を予測する因子を網羅的に解析しても、ウイルス側要因は非常に重要な因子であることが徐々に明らかになっている。

一方、抗ウイルス療法として、NS3-4 protease阻害剤であるTelaprevirが臨床試験の途上であり、著しい成果が期待されている。すなわち、従来のペグインターフェロン+リバビリン療法での2週間のウイルス減少率2log程度であるのに対し、ペグインターフェロン+リバビリン+Telaprevirの3者併用療法では、これをはるかに凌駕するウイルス減少がみられている。しかし、全く反応がみられないnull response例や、Telapre-

virに対する耐性変異を獲得するHCVも存在し、皮疹などの重篤な副作用も散見される²²⁾。したがって、これまで以上に治療効果予測が重要になり、治療法選択の判断材料として、やはり遺伝子変異の測定が重要な意味を持つものと思われる。

文 献

- 1) McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff ER, et al: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med 339: 1485-1492: 1998
- 2) Davis GL, Esteban-Mur R, Rustgi V, et al: Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med 339: 1493-1499: 1998
- 3) Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. Lancet 358: 958-965: 2001

- 4) Fried NW, Shiffman ML, Reddy KR, et al: Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347:975-982: 2002
- 5) Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, et al: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol* 40:993-999: 2004
- 6) 研究代表者 熊田博光: B型及びC型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究. 厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業(肝炎分野)平成19年度総括・分担報告書. 2008
- 7) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al: Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334:77-81: 1996
- 8) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al: Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 96:224-230: 1995
- 9) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al: Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. *J Med Virol* 78:83-90: 2006
- 10) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al: Predictors of viral kinetics to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* 79:1686-1695: 2007
- 11) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al: 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: 2007
- 12) Donlin MJ, Cannon NA, Yao E, et al: Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy. *J Virol* 81:8211-8224: 2007
- 13) El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, et al: Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48:38-47: 2008
- 14) 坂本 穰, 榎本信幸: C型肝炎ウイルス変異と治療反応性. 消化器疾患最新の治療. 菅野健太郎, 上西紀夫, 井廻道夫編. 南江堂, 東京. 31-34: 2009
- 15) Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, et al: Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. *J Virol* 11:394-403: 2004
- 16) 坂本 穰, 榎本信幸: ウイルス性慢性肝炎: 診断と治療の進歩. *日本内科学会誌* 97:57-63: 2008
- 17) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al: Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 46:1357-1364: 2007
- 18) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸: Hepatitis virus genome wide analysis. 肝疾患 Review 2008-2009. 小俣政男監修. 日本メデイカルセンター, 東京. 92-97: 2008
- 19) Berg T, von Wagner M, Nasser S, et al: Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. *Gastroenterology* 130:1086-1097: 2006
- 20) Sánchez-Tapias JM, Diago M, Escartin P, et al: Peginterferon-alfa 2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. *Gastroenterology* 131:451-460: 2006
- 21) 坂本 穰, 榎本信幸: 治療効果予測とテーラーメイド治療の可能性. *消化器の臨床* 12:68-73: 2009
- 22) Lawitz E, Rodriguez-Torres M, Muir AJ, et al: Antiviral effects and safety of terapeutic peginterferon alfa-2a, and ribavirin for 28 days in hepatitis C patients. *J Hepatol* 49:163-169: 2008

〔論文受領, 平成21年3月2日〕
〔受理, 平成21年3月3日〕

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

ウイルス変異からみたC型慢性肝炎の治療法*

坂本 穰**
榎本 信幸***

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

はじめに

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

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

1b型かつ高ウイルス量症例の治療成績

C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)は

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

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

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

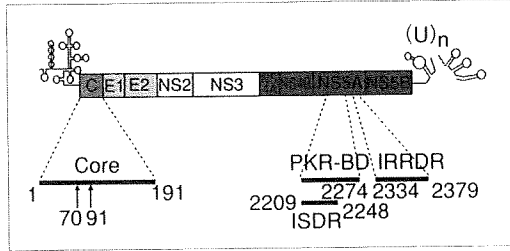


図1 インターフェロン感受性に関連するC型肝炎ウイルスの遺伝子変異

+1本鎖のRNAウイルスであり、ゲノムの両端に非翻訳領域が存在し、中央部には約3,010個のアミノ酸からなる1本のポリ蛋白前駆体をコードするopen reading frameが存在する。この領域にはHCVの構造蛋白(コア, エンベロープ蛋白)とウイルス増殖に必要な種々の酵素をコードする非構造領域(nonstructural region : NS)が存在する。これまで、1b型のHCVのインターフェロン治療の治療効果規定因子として明らかになっているウイルス側の因子として、インターフェロン感受性領域(interferon sensitivity determining region : ISDR)^{2,3)}、コアアミノ酸変異^{4, 7)}、IFN/RBV抵抗性領域(IFN/RBV resistance-determining region : IRRDR)⁸⁾などが報告されている(図1)。

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

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

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

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

(n=194)

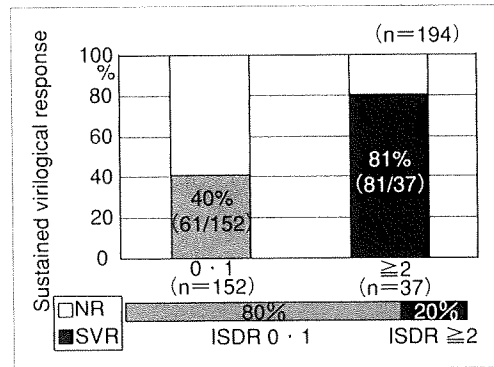


図2 1b型かつ高ウイルス量症例の48週間のペグインターフェロン+リバビリン療法のISDR変異数別SVR率

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

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

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

(n=152)多変量ロジステック回帰分析.

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

難治例に対する治療の工夫

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

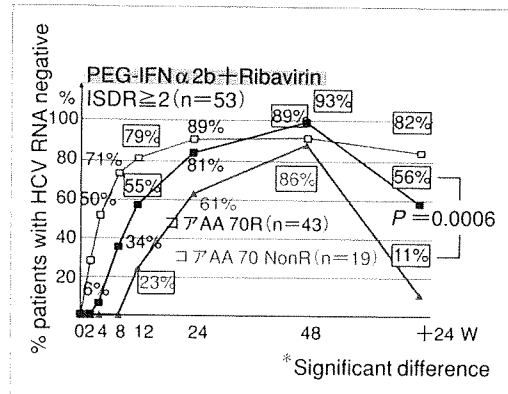


図3 ISDRとコアアミノ酸変異からみたウイルス累積陰性化率

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

表3 1b型かつ高ウイルス例のC型肝炎ウイルス変異に基づく治療戦略

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

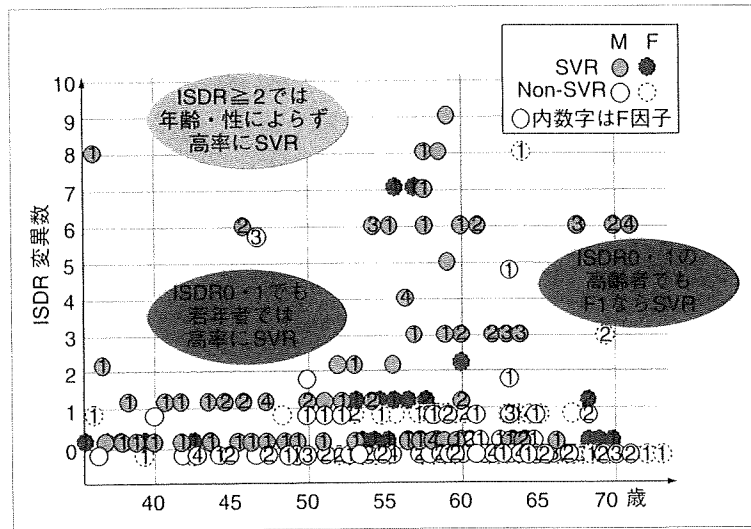


図4 ISDR・年齢・性別・肝線維化とSVRの関係

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

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

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

個別化治療の可能性

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

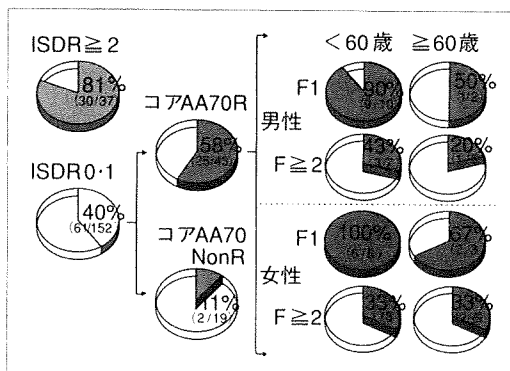


図5 遺伝子変異と宿主因子からみた1bかつ高ウイルス量症例に対するペグインターフェロン＋リバビリン併用療法48週の治療成績

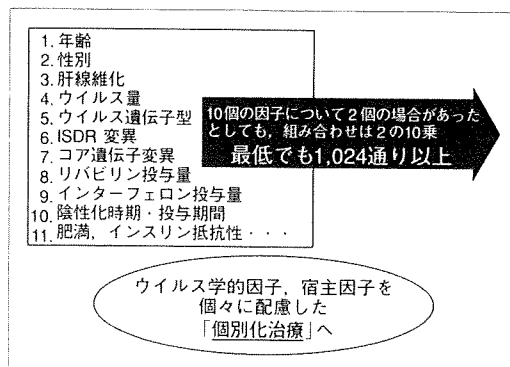


図6 遺伝子変異からみた1b型の慢性肝炎に対する個別化医療

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

文 献

1) 平成20年度厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業(肝炎分野). B型及びC型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究. 総括分担報告書. 2008.
 2) Enomoto N, Sukuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C

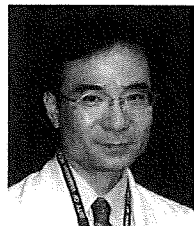
virus 1b infection. N Engl J Med 1996 ; 334 : 77-81.
 3) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. J Clin Invest 1995 ; 96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

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

* * *

C型肝炎ウイルス変異に基づく治療戦略

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



坂本 穰(写真) 榎本信幸

Minoru SAKAMOTO¹ and Nobuyuki ENOMOTO²

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

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

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

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

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

● インターフェロンの治療効果に関連した遺伝子変異

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

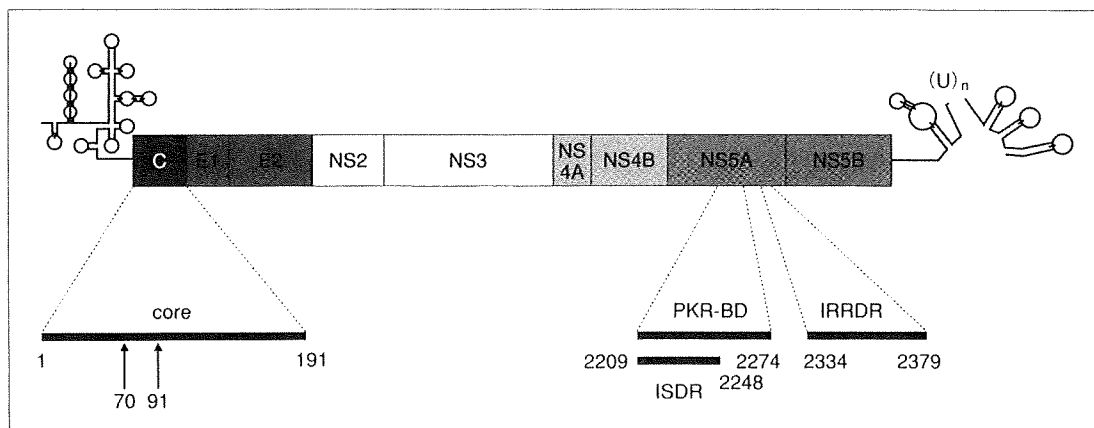


図 1 インターフェロン感受性に関連するC型肝炎ウイルスの遺伝子変異

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

ISDR

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

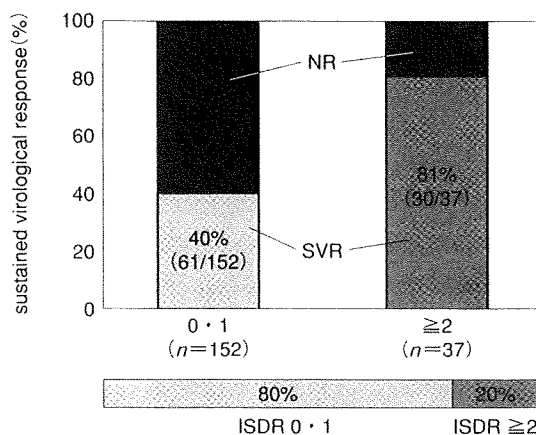


図 2 1b型かつ高ウイルス量症例の48週間のペグインターフェロン+リバビリン併用療法における ISDR 変異数と SVR 達成率 (Y-PERS 集積症例) (n=194)

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

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

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

n=194. 多変量ロジスティック回帰分析.

ISDRとコアアミノ酸変異を組み合わせた効果予測と治療戦略

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

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

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

表 2 1b型かつ高ウイルス例のC型肝炎変異に基づく治療戦略

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

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

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

🎯 テーラーメイド治療の可能性

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

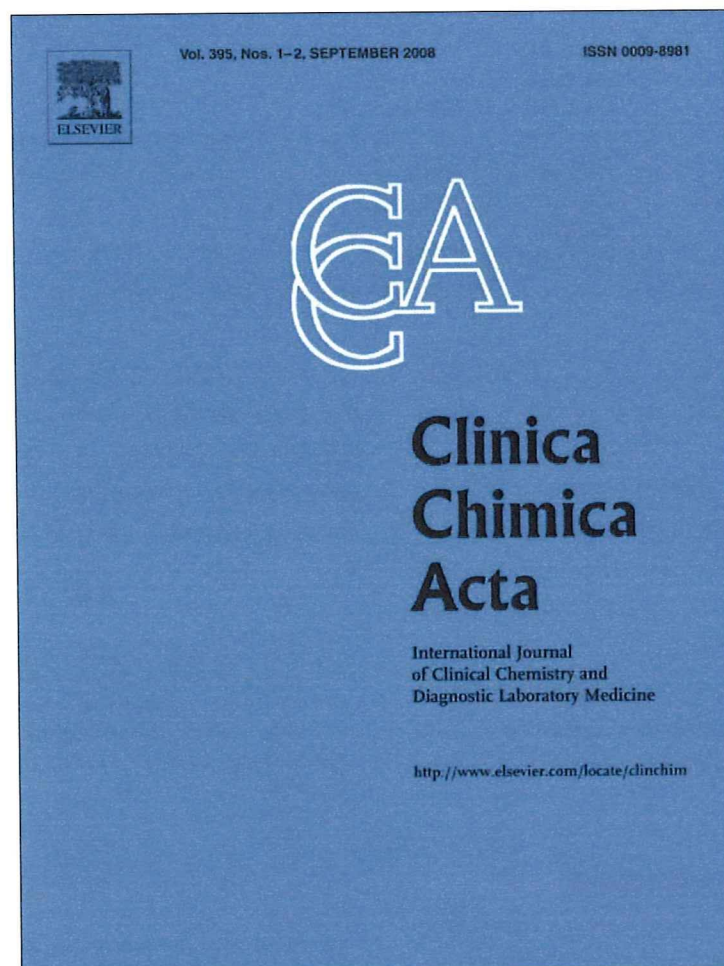
れ、ウイルス側因子により SVR が期待されながらウイルス排除がなされなかった症例では高齢、線維化進展例などが多かった。今後はこれら因子を組み合わせ個々に判断することで、近い将来のいわゆる個別化医療が可能になるものと思われる。

文献

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

* * *

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

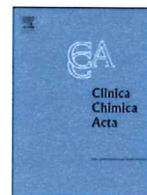


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using TaqMan-minor groove binder probes

Rui Hua^a, Yasuo Tanaka^{a,b,*}, Kenichi Fukai^c, Motohisa Tada^a, Motoko Seto^a, Yoshinari Asaoka^a, Miki Ohta^a, Tadashi Goto^a, Fumihiko Kanai^{a,b}, Naoya Kato^a, Haruhiko Yoshida^a, Takao Kawabe^a, Osamu Yokosuka^c, Masao Omata^a

^a Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^b Department of Clinical Drug Evaluation, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^c Department of Medicine and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba City, Chiba 260-8670, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2008

Received in revised form 29 May 2008

Accepted 11 June 2008

Available online 15 June 2008

Keywords:

Hepatitis B virus

YMDD mutant

TaqMan PCR

Minor groove binder probe

ABSTRACT

Background: TaqMan-minor groove binder (MGB) probes were used in a real-time PCR-based assay for the rapid and accurate detection of hepatitis B virus (HBV) YMDD mutants.

Methods: TaqMan-MGB probes were designed to distinguish between wild-type (YMDD) and mutant (YVDD and YIDD) strains of HBV. The detection limit and sensitivity of the assay were determined using a dilution series of a mixture of wild-type and mutant plasmids. Serum samples collected from four patients with chronic mutant HBV infections during lamivudine therapy were analyzed using this method.

Results: The detection limit for YVDD and YIDD was 10 and 50 copies, respectively, whereas the sensitivity was 10% within a mixed virus population. In the clinical samples, mutant strains of HBV could be detected at levels <2.6 log copies/ml of HBV DNA. While 15 of the 21 samples tested by this method were positive for the YMDD mutant, direct sequencing and a reverse hybridization line probe assay (INNO-LiPA HBV DR v2) detected the mutant strain in only 11 and 9 samples, respectively. Moreover, the data for 6 samples analyzed by TA cloning were fully consistent with our TaqMan PCR results.

Conclusions: We successfully established a sensitive and accurate assay for the YMDD mutant of HBV. This method may be useful for monitoring patients treated with lamivudine.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic hepatitis B virus (HBV) infections have serious effects on human health, with 1 million people worldwide dying from HBV-related hepatic failure, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma annually [1]. Nucleoside analogs such as lamivudine are currently approved for use as antiviral drugs, but lamivudine monotherapy promotes the emergence of resistant viral strains. The principal mutations identified in HBV as a result of lamivudine treatment are located at codon 204, within the tyrosine–methionine–aspartate–aspartate (YMDD) motif of the virus' reverse transcriptase, leading to the replacement of methionine (M) by valine (V) or isoleucine (I) (M204V/I). For detecting the YMDD mutant, direct sequencing is the most accurate method, but its sensitivity is limited (approximately

20% of the total virus population). Other simpler and more accurate molecular techniques have been developed to overcome some of the limitations of DNA sequencing, including restriction fragment length polymorphism analysis [2], 5' nuclease assays [3], melting point analysis [4], line probe assays [5], and peptide nucleic acid-mediated PCR clamping [6]. Real-time PCR using mutation-specific primers [7] or TaqMan probes [8] can be used to rapidly detect and quantify lamivudine-resistant mutations, but the sensitivity of these methods is not sufficiently high to detect the mutants at levels below 2.6 log copies/ml of HBV DNA.

In this study, we established a novel rapid, sensitive, and accurate assay for mutations in HBV based on real-time PCR using TaqMan-MGB probes. TaqMan-MGB probes have a fluorophore at the 5'-end and a nonfluorescent quencher at the 3'-end that produce very low background and strong hybridization-triggered fluorescence, resulting in high levels of accuracy and sensitivity [9]. This assay allowed us to rapidly detect HBV mutants in clinical samples with high sensitivity and accuracy, and may be useful for monitoring lamivudine-resistant mutations during lamivudine therapy.

* Corresponding author. Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan. Tel.: +81 3 3815 5411x33070; fax: +81 3 3814 0021.

E-mail address: yatanaka-g@umin.ac.jp (Y. Tanaka).

2. Methods

2.1. Plasmid DNA controls

Three plasmids (wild-type: 204 M [ATG], mutant: 204 V [GTG] and 204I [ATT]) were used to validate the specificity and sensitivity of the assay [10].

2.2. Patients and samples

Patients whose viral titers increased during lamivudine therapy were examined for the presence of YMDD mutations. Twenty-one serum samples from 4 patients were analyzed. Informed consent was obtained from all patients, and the appropriate institutional review board approved this study. The relative amount of HBV DNA was determined using a Roche Amplicor Monitor test (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) with a detection limit of 2.6 log copies/ml, which is equivalent to about 400 copies/ml.

HBV DNA was extracted from the serum samples using a QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. For each sample, 1 ml of serum was used and the extracted DNA was eluted in 60 µl of elution buffer. The extracted DNA was stored at -20 °C until use.

2.3. TaqMan PCR using TaqMan-MGB probes

The samples were amplified using an ABI 7000 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the results were analyzed using 7000 system SDS software. The primers and probes used were as follows: Forward primer, 5'-GGGCTTCCCCACTGTT-3'; reverse primer, 5'-GTACAGACTTGGCCCCAATAC-3'; YMDD probe, 5'-FAM-CTTTCAGTTA-TATGGATGATG-MGB-3'; YVDD probe, 5'-VIC-CTTTCAGTTATGTGGATGATG-MGB-3'; and YIDD probe, 5'-VIC-CTTTCAGTTATATGTGGATGATG-MGB-3'. Two separate reaction mixtures were prepared to detect the YVDD and YIDD mutants. TaqMan PCR amplification was performed in a 96-well plate in a 25-µl volume containing 1 µl of the extracted HBV DNA, 0.9 µmol/l primers, 0.2 µmol/l each probe (YMDD and YVDD or YIDD), and 12.5 µl of Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). All of the reactions were performed in triplicate. The program used included 40 cycles at 95°C for 15 s followed by 62°C for 1 min.

2.4. Direct sequencing and TA cloning

Direct sequencing and TA cloning were carried out as described previously [11]. PCR was performed using 5'-TGGGCTCAGTCCGTTCTC-3' (HBV nucleotides [nt] 647–666) and 5'-GGACTCAAGATGTTGATACAG-3' (HBV nt 786–767) as the sense and antisense primers, respectively.

2.5. Reverse hybridization line probe assay

An *in vitro* reverse hybridization line probe assay was performed using an INNO-LiPA HBV DR v2 Kit (Innogenetics NV, Gent, Belgium) with human serum or plasma samples in accordance with the manufacturer's instructions [12].

3. Results

3.1. Determination of the specificity of the TaqMan-MGB probes

Cross-reactivity tests were performed to ensure that the probes specifically bound their targets. A dilution series of each plasmid (10^8 – 10^2 copies) was used as the template for TaqMan PCR. A negative control was included to avoid nonspecific amplification. Each single YMDD, YVDD, and YIDD probes were able to detect only the corresponding plasmid between 10^8 and 10^2 copies. Furthermore, mixtures containing the wild-type (YMDD) and mutant (YVDD or YIDD) probes also detect only its corresponding plasmid between 10^8 and 10^2 copies, thereby showing specificity for their target sequences (data not shown).

3.2. Determination of the sensitivity and detection limits of the TaqMan-MGB probes

Mixtures containing the wild-type (YMDD) and mutant (YVDD or YIDD) plasmids were used to determine the sensitivity of the assay. The wild-type and mutant plasmids were mixed at a ratio of 100:0, 90:10, 80:20, 50:50, 20:80, 10:90, or 0:100, corresponding to a final concentration of 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , and 10^2 copies, respectively. Using the plasmid mixture as a template, real-time TaqMan PCR was performed. In all cases, 10% of the YVDD mutants among 10^2 copies present in the mixture were detected using this assay. With regard to YIDD, however, 10% of 500 copies were successfully detected (data not shown). These results suggest that the detection limits for the YVDD and YIDD mutants were 10 and 50 copies, respectively, whereas the level of sensitivity was 10% within a mixed virus population. The detection limit for direct sequencing was 20% when the mutant and wild-type plasmids were mixed at the same ratios (100:0, 90:10, 80:20, 50:50, 20:80, 10:90, and 0:100) at a concentration of 10^5 copies (data not shown), suggesting that our PCR-based method is superior to direct sequencing for detecting mutant strains present at a low copy number.

Table 1

HBV mutant at codon 204 determined by TaqMan PCR, sequencing, INNO-LiPA HBV DR v2 assay and TA cloning

Patient/sample	Time of sampling ^a (weeks)	HBV DNA ^b (Log copies/ml)	ALT(IU/L)	Taqman PCR ^c	Direct sequencing	INNO-LiPA HBV DR v2	Sequencing of TA cloning
A							
1	Pretreatment	7.5	264	M	M	M	
2	On treatment 20	<2.6	39	M/I	M	N/A ^d	M/I
3	On treatment 60	4.3	26	M/I	M	M	M/I
4	On treatment 68	4.4	34	M/I	M/I	I	
5	On treatment 76	6.3	30	I	I		
B							
1	Pretreatment	6.3	52	M	M	M	
2	On treatment 12	<2.6	33	M/I	M	N/A ^d	M/V/I
3	On treatment 56	5.1	50	V/I	V/I	M/V/I	
4	On treatment 84	6	44	V/I	V/I	M/V/I	
5	On treatment 100	6.9	60	V/I	V/I	M/V/I	
C							
1	Pretreatment	>7.6	60	M	M	M	
2	On treatment 4	6.5	63	M	M	M	
3	On treatment 20	5.4	28	M	M	N/A ^d	
4	On treatment 40	6.8	27	M/V/I	M/V/I	M/V/I	M/V/I
5	On treatment 44	>7.6	48	M/V/I	M/V/I	M/V/I	
D							
1	Pretreatment	>7.6	61	M	M	M	
2	On treatment 12	3.4	28	M/I	M	M	M/I
3	On treatment 36	3.2	17	M/I	M/I	M	
4	On treatment 60	2.7	10	M/I	M/I	M	
5	On treatment 84	3	12	M/V/I	M/I	M/V/I	
6	On treatment 104	5.2	12	M/V/I	V	M/V/I	M/V/I

^a Number of weeks relative to treatment.

^b Measured by Cobas Amplicor Monitor.

^c M, methionine; V, valine; I, isoleucine.

^d N/A, Not amplified (PCR failure).

3.3. Comparison of real-time TaqMan PCR and direct sequencing

We next examined HBV clinical samples using both our PCR-based assay and direct sequencing. As shown in Table 1, the results produced by real-time TaqMan PCR and direct sequencing were fully concordant in 14 samples (14/21, 66.7%). In the remaining seven samples, however, the results were different. In all of the discordant results, real-time TaqMan PCR identified an extra mutant.

3.4. Real-time TaqMan PCR versus a reverse hybridization line probe assay

To further validate the accuracy and sensitivity of our real-time TaqMan PCR-based method, all of the samples were tested by reverse hybridization line probe assay using an INNO-LiPA HBV DR v2 Kit. As shown in Table 1, the results for 10 samples (47.6%) were fully concordant between the 2 assays. In four of the samples (A-3, D-2, D-3, and D-4), however, in which the level of HBV DNA ranged from 2.7 to 4.4 log copies/ml, only the wild-type sequence was detected by the reverse hybridization line probe assay. Neither the wild-type nor the mutant sequence was detected in 2 samples (A-2 and B-2) in which the level of HBV DNA was below 2.6 log copies/ml due to PCR failure. No amplification was observed with a third sample (C-3), but its HBV DNA level was 5.4 log copies/ml.

3.5. Validation of the discordant TaqMan PCR, direct sequencing, and reverse hybridization line probe assay results by subcloning and sequencing

To further evaluate these 3 methods, 6 of the samples (A-2, A-3, B-2, C-4, D-2, and D-6) were cloned following PCR amplification. After subcloning, 20 clones per sample were picked at random and sequenced. As shown in Tables 1 and 2, our real-time TaqMan PCR results were fully concordant with those produced by subcloning and sequencing, except for those involving sample B-2, in which the sequence GTG was detected only by TA cloning. Thus, those mutant viral strains that were present in minor amounts in the mixtures were more likely to be detected by real-time TaqMan PCR. Although the HBV DNA level was below 2.6 log copies/ml in samples A-2 and B-2, the YIDD mutant was detected only by real-time TaqMan PCR, and not by direct sequencing or the line probe assay.

Table 2
Sequences obtained by TA cloning in six HBV samples

Sample/codon 204 ^a	Sequence obtained by TA cloning	Number of clones obtained
A-2		
M	ATG	17/20 (85.0%)
V	–	–
I	ATC	3/20 (15.0%)
A-3		
M	ATG	19/20 (95.0%)
V	–	–
I	ATC	1/20 (5.0%)
B-2		
M	ATG	18/20 (90.0%)
V	GTG	1/20 (5.0%)
I	ATC	1/20 (5.0%)
C-4		
M	ATG	18/20 (90.0%)
V	GTG	1/20 (5.0%)
I	ATT	1/20 (5.0%)
D-2		
M	ATG	11/20 (55.0%)
V	–	–
I	ATC	9/20 (45.0%)
D-6		
M	ATG	1/20 (5.0%)
V	GTG	18/20 (90.0%)
I	ATA	1/20 (5.0%)

^a M, methionine; V, valine; I, isoleucine.

4. Discussion

In the present study, we established a novel rapid, sensitive, and accurate method for detecting YMDD mutants using TaqMan-MGB probes. The detection limit of this method is 10 copies for YVDD and 50 copies for YIDD with 10% sensitivity within a mixed virus population.

The assay was compared with direct sequencing and a reverse hybridization line probe assay by analyzing clinical samples. The results produced using our PCR-based method were correlated with those obtained by direct sequencing and the reverse hybridization line probe assay; however, in some samples containing a mixed population of wild-type and mutant virus (e.g., A-3), the minor mutant clone was detected only by real-time TaqMan PCR. The reverse hybridization line probe assay is also a sensitive method for detecting lamivudine-resistant mutations, but its sensitivity seems to depend on the viral load. To validate the accuracy of our TaqMan PCR-based assay, 6 samples were selected for subcloning and sequencing. All of the results were concordant with those produced by real-time TaqMan PCR, suggesting the accuracy and superiority of our novel method.

Our assay is similar to the method of Malmstrom et al. [8], which is a modification of a previously reported method using the LightCycler [13]. In that study, three types of probes labeled with different fluorophores were mixed and used for analysis, but the authors did not report the sensitivity and specificity of their assay. In the present study, a mixture of three probes resulted in reduced specificity and sensitivity, and was therefore not suitable for analysis (data not shown). Thus, we employed a mixture of only two probes. Note that the detection limit in the aforementioned study for a minor population was 10%, which is similar to that obtained using our method. Based on these results, we propose that our assay is superior to theirs.

In conclusion, we established a novel rapid, simple, and sensitive assay to detect lamivudine-related HBV mutants. This method will be useful for the early detection and monitoring of resistant mutants during lamivudine therapy.

Acknowledgements

This study was supported in part by Health and Labor Sciences Research Grants for Research on Hepatitis from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. We thank Mr. Tokio Onozaki (Application Support Department, Applied Biosystems, Japan) and Ms. Emi Sakamoto (Sales Department, Applied Biosystems, Japan) for design of TaqMan probes, technical assistance and helpful discussions.

References

- [1] Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733–45.
- [2] Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyano Y, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711–6.
- [3] Allen MI, Gauthier J, DesLauriers M, Bourne EJ, Carrick KM, Baldanti F, et al. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol* 1999;37:3338–47.
- [4] Cane PA, Mutimer D, Ratcliffe D, Cook P, Beards G, Elias E, et al. Analysis of hepatitis B virus quasispecies changes during emergence and reversion of lamivudine resistance in liver transplantation. *Antivir Ther* 1999;4:7–14.
- [5] Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000;38:702–7.
- [6] Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, Itoh Y, Nakamura H, Morita A, et al. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. *J Hepatol* 2002;37:259–65.
- [7] Shi M, Yang ZJ, Wang RS, Zhang H, Zhu YF, Xu YP, et al. Rapid quantitation of lamivudine-resistant mutants in lamivudine treated and untreated patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Chim Acta* 2006;373:172–5.
- [8] Malmstrom S, Hannoun C, Lindh M. Mutation analysis of lamivudine resistant hepatitis B virus strains by TaqMan PCR. *J Virol Methods* 2007;143:147–52.

- [9] Afonina IA, Reed MW, Lusby E, Shishkina IG, Belousov YS. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques* 2002;32:940–4.
- [10] Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Masaki T, Lan KH, Carrilho FJ, et al. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: a study by in vitro full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 1999;29:939–45.
- [11] Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, et al. Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. *Oncogene* 2006;25:2950–2.
- [12] Hussain M, Fung S, Libbrecht E, Sablon E, Cursaro C, Andreone P, et al. Sensitive line probe assay that simultaneously detects mutations conveying resistance to lamivudine and adefovir. *J Clin Microbiol* 2006;44:1094–7.
- [13] Cane PA, Cook P, Ratcliffe D, Mutimer D, Pillay D. Use of real-time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1600–8.