

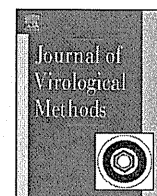
- 22 Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H: Amino acid substitution in HCV core region and genetic variation near *IL28B* gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010;52:421–429.
- 23 Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K: Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9524–9528.
- 24 Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C: 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.
- 25 Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y: A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J Hum Genet* 2001;46:471–477.
- 26 Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al: Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003;34:395–402.
- 27 Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, et al: Interleukin-28B Polymorphism Improves Viral Kinetics and Is the Strongest Pretreatment Predictor of Sustained Virologic Response in Hepatitis C Virus-1 Patients. *Gastroenterology* 2010;139:120–129.
- 28 Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Predictors of viral kinetics to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol* 2007;79:1686–1695.
- 29 Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H: Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin. *J Med Virol* 2010;82:575–582.
- 30 El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H: Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 2008;48:38–47.
- 31 Lin C, Gates CA, Rao BG, Brennan DL, Fulghum JR, Luong YP, Frantz JD, Lin K, Ma S, Wei YY, Perni RB, Kwong AD: In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *J Biol Chem* 2005;280:36784–36791.
- 32 Forestier N, Reesink HW, Weegink CJ, McNair L, Kieffer TL, Chu HM, Purdy S, Jansen PL, Zeuzem S: Antiviral activity of telaprevir (VX-950) and peginterferon alfa-2a in patients with hepatitis C. *Hepatology* 2007;46:640–648.
- 33 Zhou Y, Müh U, Hanzelka BL, Bartels DJ, Wei Y, Rao BG, Brennan DL, Tigges AM, Swenson L, Kwong AD, Lin C: Phenotypic and structural analyses of hepatitis C virus NS3 protease Arg155 variants: sensitivity to telaprevir (VX-950) and interferon alpha. *J Biol Chem* 2007;282:22619–22628.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jviromet](http://www.elsevier.com/locate/jviromet)

## Protocols

## Rapid detection of drug-resistant mutations in hepatitis B virus by the PCR-Invader assay

Kenichi Tadokoro<sup>a,\*</sup>, Fumitaka Suzuki<sup>b</sup>, Mariko Kobayashi<sup>c</sup>, Toshikazu Yamaguchi<sup>a</sup>, Makoto Nagano<sup>a</sup>, Toru Egashira<sup>a</sup>, Hiromitsu Kumada<sup>b</sup><sup>a</sup> Laboratory Management Section, BML, Inc., 1361-1, Matoba, Kawagoe-shi, Saitama 350-1101, Japan<sup>b</sup> Department of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo 105-8470, Japan<sup>c</sup> Research Institute for Hepatology, Toranomon Branch Hospital, Kanagawa 213-8587, Japan

## A B S T R A C T

Early detection of resistant mutations of hepatitis B virus (HBV) is important for patients on nucleos(t)ide analog therapy. An assay based on the PCR-Invader technology was developed to detect resistant mutations with high sensitivity. The assay specifically detects mutations at codons 180, 181, 184, 202, 204, and 250 of the HBV polymerase reverse transcriptase domain. These mutations result in resistance to lamivudine and entecavir. In mixtures of plasmids containing wild-type and resistant mutants, fold-over-zero values for resistant mutations were detected in 2% of the total. Seventy-five serum samples from patients, whose treatment had been switched from lamivudine to entecavir, were examined by the PCR-Invader assay and direct sequencing. The PCR-Invader assay detected all resistant mutations that were detected by direct sequencing and even detected the presence of mutants that direct sequencing could not. Cloning sequencing confirmed those mutations found by the PCR-Invader assay and not by direct sequencing. The PCR-Invader assay is a useful tool for the early detection of drug-resistant mutations.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Article history:

Received 4 August 2010

Received in revised form 4 October 2010

Accepted 6 October 2010

Available online 13 October 2010

## Keywords:

Hepatitis B virus

PCR-Invader

Drug-resistant mutation

Lamivudine

Entecavir

## 1. Introduction

Infection by hepatitis B virus (HBV) is a significant worldwide health problem. Chronic HBV infection can result in cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Manigold and Rehermann, 2003). Nucleos(t)ide analogs (NA) therapies have reduced the morbidity and mortality of HBV infection. In Japan, three NA therapies, lamivudine (LVD), adefovir (ADV) and entecavir (ETV), have been approved for clinical use. The NA therapy controls virus amplification and halts the clinical progression of liver disease.

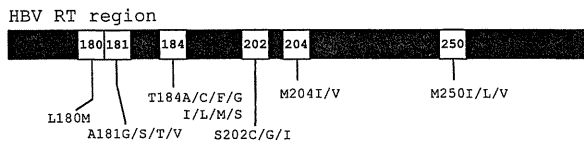
Unfortunately, with long-term NA therapy, drug-resistant mutations often emerge. After 60 months of therapy, LVD resistance is reported in 50–80% of patients (Hashimoto et al., 2010; Suzuki et al., 2003; Zoulim and Locarnini, 2009). Two mutations (rtM204I/V) in the YMDD catalytic motif within the C domain of HBV reverse transcriptase (RT) are mainly associated with LVD resistance. Compensatory mutations (rtV173L and rtI180M) are located in the B domain. The rtA181S/T/V mutation is associated with resistance to LVD and ADV therapy (Lee et al., 2006; Yatsuji et al., 2008). Another mutation (rtA181G) was detected in a patient on ETV therapy (Villet et al., 2007). Various mutations at rtT184,

rtS202 and rtM250 (e.g., rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtS202C/G/I and rtM250I/L/V) are associated with resistance to ETV therapy. In addition to LVD resistance (L180M+M204V), ETV resistance is caused by one or more mutations at rtT184, rtS202 and rtM250 (Locarnini, 2008; Zoulim and Locarnini, 2009).

Detecting resistant variants is critical for appropriate patient treatment. For example, by monitoring resistance, physicians can adjust drugs when needed. ETV resistance develops at a very low rate (1.2%) in treatment-naïve patients after 5 years (Zoulim and Locarnini, 2009). Switching LVD-pretreated patients to ETV therapy is done in Japan (Suzuki et al., 2010). However, in patients with LVD resistance, the rate for ETV resistance jumps to 51% (Zoulim and Locarnini, 2009). Furthermore, resistant mutations do not always result in virologic rebound (Tenney et al., 2007). Knowing the approximate ratio of resistant mutations to wild-type virus is as important as monitoring the HBV viral load, but measuring the ratios of all resistant mutations is difficult and expensive.

This report describes a novel approach that uses the PCR-Invader assay in a comparative semi-quantitative assay for LVD- and ETV-resistant mutations in HBV DNA. The Invader technology is very useful for detecting single nucleotide polymorphisms from genomic DNA or PCR products (Lyamichev et al., 2000) and for genotyping viruses (Germer et al., 2006). It is easily adapted as a high-throughput assay for various sequences with a common fluorescent-dye labeled probe. In addition, the Invader method

\* Corresponding author. Tel.: +81 49 232 0440; fax: +81 49 232 5480.  
E-mail address: [tado-k@bml.co.jp](mailto:tado-k@bml.co.jp) (K. Tadokoro).



**Fig. 1.** Drug-resistant mutations were detected by the PCR-Invader assay. Resistance to LVD is caused mainly by mutations in the YMDD motif (rtM204I and rtM204V). The rtL180M mutation is regarded as a compensatory mutation that restores replication capacity. The rtL180M+rtM204V mutations combine with a mutation at rtT184 and/or rtS202 and/or rtM250 to form ETV resistance.

has been applied to quantify the heteroplasmy of mutant mitochondrial DNAs (Mashima et al., 2004). In this study, the Invader technology was applied to identify drug-resistant mutations in HBV infections. Although the probe design was challenging because of the variety of HBV DNAs, the PCR-Invader assay could detect multiple drug-resistant mutations with high sensitivity at same time. To demonstrate its sensitivity and effectiveness, the method was used to detect resistant mutations in clinical samples, and the results were compared to those from sequencing.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Source of patient samples

Seventy-five serum samples were obtained from patients on NA therapy. The treatment for each patient had been changed from LVD to ETV. The study was conducted in accord with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Toranomon Hospital Ethical Committee. Written informed consent was obtained from each patient.

### 2.2. Design of Invader probes

The primary probe and Invader oligo to detect resistant mutations (rtL180M, rtA181G/S/T/V, rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtS202C/G/I, rtM204I/V, rtM250I/L/V) were designed with the Invader technology creator (TWT, Madison, WI, USA) (Fig. 1). Variations in neighbor regions were confirmed by analyzing 491 individual sequences of the HBV complete genome from National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (Table 1).

### 2.3. HBV DNA extraction and PCR amplification

By using the PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), HBV DNA was extracted from 200  $\mu$ l of serum and eluted in RNase/DNase-free water. The HBV polymerase RT domain, which is encoded by amino acids 156–288, was amplified by PCR with primer pairs (sense: 5'-CACYGTATTCCCATCCCATCRTC-3', anti-sense: 5'-TTGACAWACYTTCCRATCRATDGG-3'). The PCR procedure was performed as described previously (Tadokoro et al., 2006). Extracted DNA was added to a 25- $\mu$ l reaction mixture containing 1  $\mu$ M of each primer, 4 mM d-UTP and 1 U UNG in a 2 $\times$  Multiplex PCR kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The reaction mixture was preheated at 50  $^{\circ}$ C for 2 min and then at 95  $^{\circ}$ C for 15 min. Amplification was carried out for 50 cycles (95  $^{\circ}$ C for 30s, 60  $^{\circ}$ C for 30s, 72  $^{\circ}$ C for 30s [10 min in the last cycle]) in a GeneAMP PCR system 9700 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland), utilizing a 96-well plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) without a mineral oil overlay. PCR amplicons were purified with AMPure reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

### 2.4. Invader reaction

Reactions were performed in 384-well plates with a Cleavase XI Invader core reagent kit (Amplified DNA) (TWT) and 2  $\mu$ l of purified PCR amplicon. Plates were preheated at 95  $^{\circ}$ C for 5 min before incubation at 65  $^{\circ}$ C for 90 min in the block incubator (BI-535; ASTEC, Hukuoka, Japan). Fluorescent intensities of FAM (carboxyfluorescein) (wavelength/bandwidth: excitation, 485/20 nm; emission, 535/25 nm) for wild-type and RED (REDmond RED) (excitation, 560/20 nm; emission, 612/10 nm) for resistant mutations were measured with a F200-FL/T-ABS fluorescence plate reader (TECAN, Durham, NC, USA) (Fig. 2). Fold-over-zero (FOZ) values were used to normalize difference between the measurements (Mashima et al., 2004). The FAM signals were normalized to those of negative control. RED signals were normalized to those of the wild-type plasmid ( $10^3$  copies) to prevent false positives.

### 2.5. Sequencing

Purified PCR amplicons were sequenced by the dideoxy method with the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a model 3130 fluorescent DNA sequencer (Applied Biosystems).

### 2.6. Manufacture of control plasmid DNA by cloning HBV-DNA

After PCR amplification of HBV-DNA in clinical samples with LVD-resistant mutations (L180M, M204I/V and wild-type), the PCR amplicons were cloned into the pCRII-TOPO vector (Life Technologies) and sequenced. Control plasmids with other resistant mutations were synthesized by site-directed mutagenesis with megaprimer (Ke and Madison, 1997).

### 2.7. Detection sensitivity and assay variation for the PCR-Invader assay

Detection sensitivity and assay variation of the PCR-Invader assay were examined with single or mixed plasmids for template DNA. The detection limit of the PCR-Invader assay was determined with a  $10^{-7}$  dilution of plasmid. A fivefold measurement was performed three times each to examine assay variation.

## 3. Results

### 3.1. Detection sensitivity of the PCR-Invader assay

The minimum amplification threshold for wild-type and resistant mutants was 10 copies of the plasmid in all reactions, and the measurements were effective throughout a range of  $10-10^6$  plasmid copies (Fig. 3). When the wild-type and resistance mutation plasmids were mixed in various ratios (Fig. 4), 10 copies of resistance mutation plasmid could be detected down to a 1:50 (2%) ratio of resistant:wild-type plasmids.

### 3.2. Comparative semi-quantitation analysis with mixed plasmids

Various ratios of the resistant mutation and wild-type plasmids were tested in the PCR-Invader assay. When the total number of template DNA was 1000 copies, the FOZ values for the resistant mutation plasmids increased in proportion for ratios between 2% and 100% (Fig. 5). When clinical samples were examined, the detection limits of the PCR-Invader assay were defined as 2%.

**Table 1**  
Primary probe/Invader oligo for ETV resistance substitutions.

Target		Sequence (5'–3')
L180M	p1 probe	<u>CGGCCGAGGR</u> DAGAAACGGRCTGAG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAGT</u> DAGAAACGGRCTGAGG
	io probe	GAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGAVHCAC
A181G	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GCCARGAGAAACGGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> CCARGAGAAACG
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNT
A181S1 <sup>a,b</sup>	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GCCARGAGAAACGGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> GACARGAGAAACG
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNT
A181S2 <sup>a</sup>	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GCCARGAGAAACGGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> CTCARGAGAAACG
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNT
A181T	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> CCARGAGAAACGGAC
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAGT</u> CARGAGAAACGGAC
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNGC
A181V	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GCCARGAGAAACGGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> ACCARGAGAAACGGA
	io probe	CTGCGAACCACTGAACAAATGGCACTAGTAAACTGNT
T184A	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> ACTWGYKCCMTTGTTC
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAGG</u> CTWGYKCCMTTGTTC
	io probe	GCCTCAGTCCGTTTCTCTYGGCTCAKTTT
T184C	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GTAACACTGAGCCARGAGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> CAAACTGAGCCARGAGA
	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAATGGMACTRA
T184F	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GTAACACTGAGCCARGAGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> AAAACTGAGCCARGAGA
	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAATGGMACTRA
T184G	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> ACTWGYKCCMTTGTTC
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAGG</u> TWGYKCCMTTGTTC
	io probe	GCCTCAGTCCGTTTCTCTYGGCTCAKTTT
T184I	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GTAACACTGAGCCAKGAGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> ATAAAGTGAACCAKAGAGA
	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAATGGMACTBC
T184L1 <sup>c</sup>	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> TRAAMTGAACCADRAGA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> GRAAMTGAACCADRAGA
	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAAKGRCRCWARA
T184L2 <sup>c</sup>	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> TRAAMTGAACCADRAG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> AGRAAMTGAACCADRAG
	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAAKGRCRCWAT
T184M	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> ACTAAACTGAGCCARGAG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> CATAAAGTGAACCCARGAG
	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAATGGMACTA
T184S <sup>d</sup>	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GTAACACTGAGCCARGAGA
	p2 probe a	<u>ACGGACGCGGAG</u> CTAAACTGAGCCARGAGA
	p2 probe b	<u>ACGGACGCGGAG</u> GAAAACTGAGCCARGAGA
S202C	io probe	CCCTGCGAACCACTGAACAAATGGMACTRA
	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> TRMADGCSAVRCARTG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> ARMADGCSAVRCARTG
S202G	io probe	MGAYTTGGCCCCAAWACCRVATCATCNAYRTARCA
	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> TRMADGCSAVRCARTG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> CRMADGCSAVRCARTG
S202I	io probe	MGAYTTGGCCCCAAWACCRVATCATCNAYRTARCA
	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> CTRMADRCSSAACAGTG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> ATRMADRCSSAACAGTG
M204I	io probe	CGACTTGGCCCCAATACCACATCATCMAYRTADT
	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> CATATARCTGARAGCCAAACAGT
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> DATATARCTGARAGCCAAACAGT
M204V	io probe	TACGACTTGGCCCCAATACCACATCATCA
	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> ATGGATGATGTGGTATTGG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> TNGATGATGTGGTATTGG
M250I	io probe	GGGCTTCCCCCACTGTTGGCTTTC DKYTATT
	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> GGWTAAYRTAATTGGAAGTTGGGG
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> HGGWTAAYRTAATTGGAAGTTGGGG
M250L	io probe	TAATAAAACCAACGTTGGGGCTACTCCCTHMAYTYATT
	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> TGAAGTTWAGGGARTADCCCA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> RGAAGTTWAGGGARTADCCCA
M250V	io probe	TGTGGTAAAGTNCCCCAACKCAATTAYRTANCCNAA
	p1 probe	<u>CGGCCGAGG</u> TGAAGTTWAGGGARTADCCCA
	p2 probe	<u>ACGGACGCGGAG</u> GGAAGTTWAGGGARTADCCCA
	io probe	TGTGGTAAAGTNCCCCAACKCAATTAYRTANCCNAA

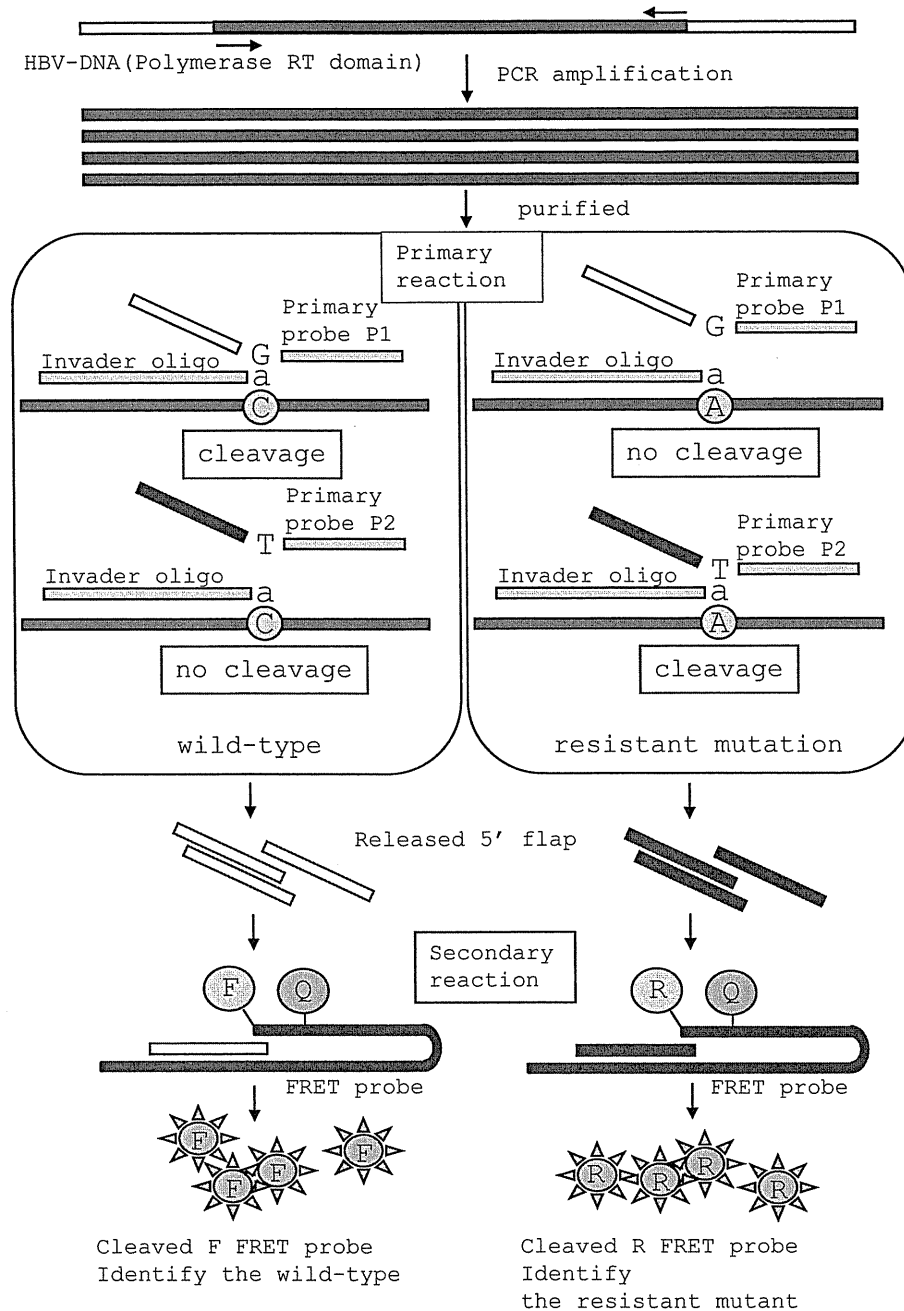
p1: primary probe (FAM); p2: primary probe (RED); io: Invader oligo; underlined sequence represents the 5' flap of probe; amino-blocked 3' end of all primary probes; boldfaced sequences denote the cleavage site of primary probes.

<sup>a</sup> A181S1 and A181S2 were designed for detection of substitution by each different codon.

<sup>b</sup> Cleavage site of A181S1 was slide from target nucleotide to prevent non-specific reaction.

<sup>c</sup> T184L was detected from combined results in T184L1 and T184L2.

<sup>d</sup> The p2 probes for T184S were mixed.



**Fig. 2.** Schematic illustration of the PCR-Invader assay at rtL180M, showing the detection of resistant mutations. A region of HBV DNA was amplified by PCR. Purified PCR products formed the invasive complex with a primary probe and the Invader oligo. The released 5'-flap, a product of the primary reaction, promotes cleavage of the generic FRET probe in secondary reaction, creating a detectable, amplified signal for wild-type or resistant mutations.

### 3.3. Detection of resistant variants in clinical samples by direct sequencing and by the PCR-Invader assay

Sequences of the HBV reverse transcriptase were obtained from 75 patient samples by direct sequencing. The same samples were examined by the PCR-Invader assay. By examining the relative ratios of resistant mutations to wild-type sequences, the PCR-Invader assay distinguished two categories: weak positives (2–20%) and positives (>20%). In direct sequencing, the rtL180M mutation was detected in 73.3% (55 of 75) of cases. Mutations at rtM204 (rtM204I and rtM204V) were detected in 50.6% (38 of 75) and 58.7% (44 of 75) of cases, respectively. These mutations were all

detected as positive by the PCR-Invader assay. The 19 mutations related to ETV resistance (located at rtT184, rtS202 and rtM250) were detected by direct sequencing (9 at rtT184, 3 at rtS202 and 7 at rtM250) in 75 samples. With the PCR-Invader assay, 24 ETV-resistant mutations were detected as positive (10 at rtT184, 7 at rtS202, 7 at rtM250), and 35 mutations were detected as weak positive (4 at rtT184, 19 at rtS202, 12 at rtM250) (Table 2). In addition, multiple ETV-resistant mutations were detected in several samples by the PCR-Invader. The samples with combinations of ETV resistance (rtL180M + rtM204V and mutations at rtT184 and/or rtS202 and/or rtM250) were detected in 15 of 75 (20%) cases by direct sequencing and in 38 of 75 (50.6%) cases by the assay (Fig. 6).

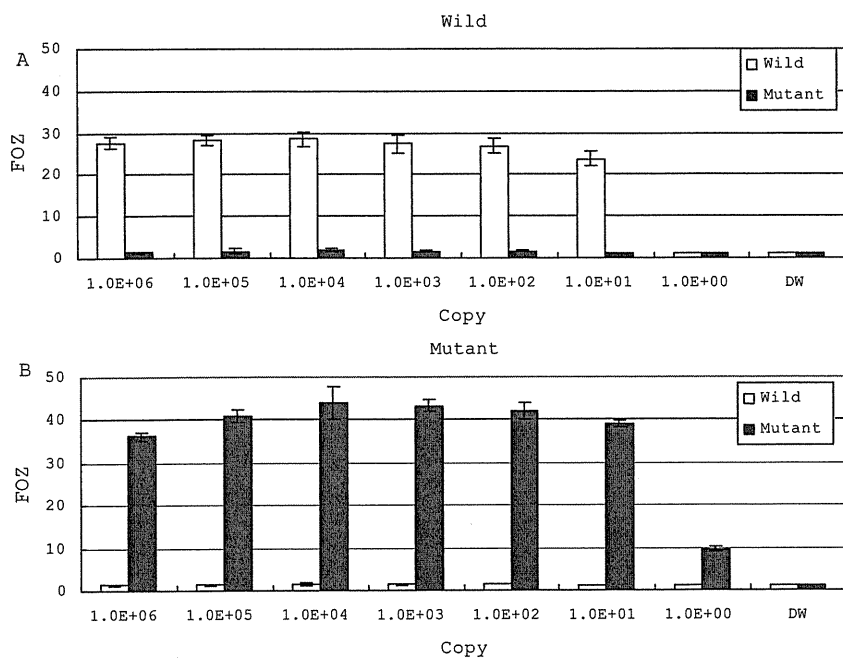


Fig. 3. The FOZ values of the PCR-Invader assay for detection of rtM250V. FOZ values of wild-type (A) and the resistant mutation (B) generated by the 10<sup>-7</sup> dilutions of plasmid DNA are shown.

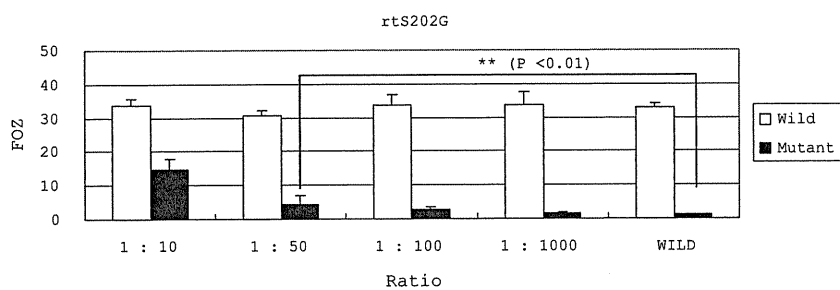


Fig. 4. Detection threshold of the PCR-Invader assay of plasmid DNAs with 10 copies of the resistant mutation (rtS202G). Plasmid DNA ratios are 1:10 to 1:1000.

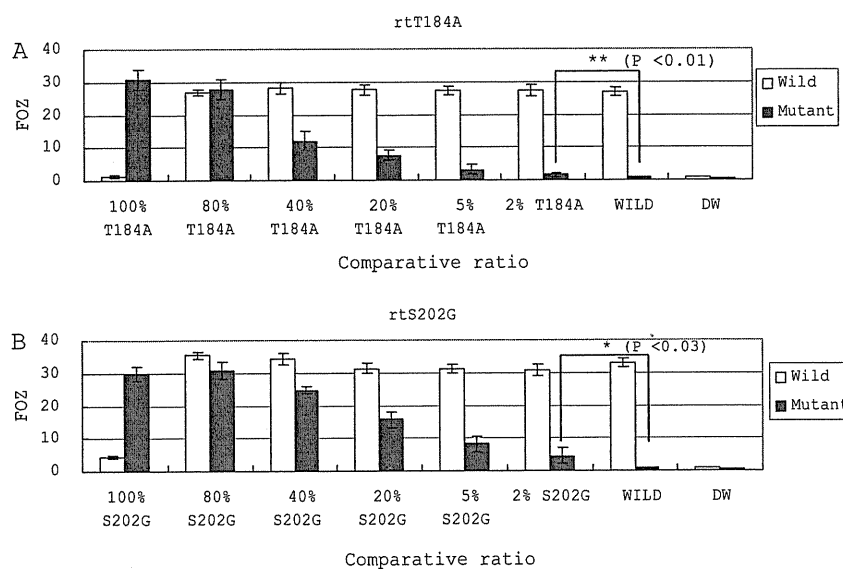
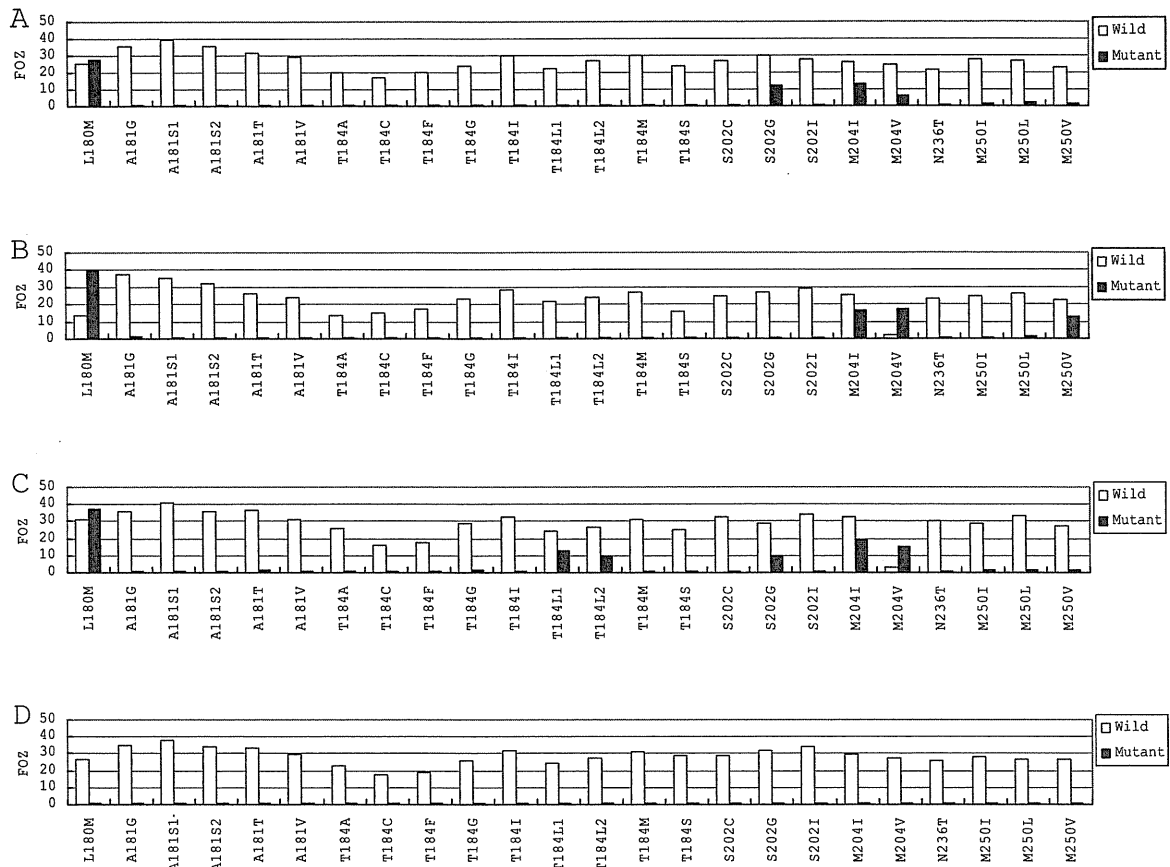


Fig. 5. FOZ values of the PCR-Invader assay using 1000 copies of plasmid DNA as template. Plasmid DNA was mixed to 0, 2, 5, 20, 40, 80, and 100% with the resistant mutation (A, rtT184A and B, rts202G).



**Fig. 6.** Fluorescence detection patterns in clinical samples (A–C) and wild-type plasmid (D). The ETV resistant mutations (rtL180M and rtM204V + either mutation at rtT184 or rtS202 or rtM250) were detected in all clinical samples (A, rtS202G; B, rtM250V; C, rtT184L + rtS202G). No resistant mutation was detected in the wild-type plasmid samples.

### 3.4. Confirmation of resistant variants by cloning sequence

To confirm the resistant variants detected by the PCR-Invader assay, but not by direct sequencing, sequences were cloned for three samples and found to have different resistant mutations. In Sample 20, ETV resistance was detected as a mutation at rtL180M + rtM204V + rtT184A. A total of 34 clones were obtained, including a resistant variant clone. The percentage of resistant variants in Sample 20 was 2.9% (1 of 34). The resistant variants included in Sample 02 (rtL180M + rtM204V + rtS202G) were 8.7% (4 of 46), and those of Sample 04 (rtL180M + rtM204V + rtM250V) were 5.6% (3 of 54) of cases (Table 3).

## 4. Discussion

Accurate detection of drug-resistant variants in HBV-DNA is critical for clinical therapies with nucleotide/nucleoside analogs. In this study, a novel method to detect LVD and ETV drug-resistant mutations is described. The PCR-Invader assay was examined for detection sensitivity and accuracy and compared with direct sequencing. Resistant mutations were detected down to 2% in 1000

**Table 3**

Number of resistant variants in cloning sequencing.

	Clone	Resistant variants (%)
Sample 20 (T184A)	34	1(2.9)
Sample 02 (S202G)	46	4(8.7)
Sample 04 (M250V)	54	3(5.6)

copies of HBV DNA. The PCR-Invader assay is a useful method for detecting drug-resistant variants in HBV-DNA.

Several existing methods can detect resistant mutations. For example, sequencing, the most popular method, detects mutant sequences when they make up more than 20% of the total (Zhang et al., 2003), and the line probe assay is a suitable method for qualitatively detecting various mutations simultaneously (Degertekin et al., 2008; Libbrecht et al., 2007). However, these have significant shortcomings. Sequencing is labor intensive, and the line probe assay is complicated and time consuming.

The PCR-Invader assay has many excellent characteristics. Its FOZ values were constant over a range of  $10^3$ – $10^6$  copies, and 10 copies of template DNA were enough for detection (Fig. 1). In examinations of mixtures of plasmids with wild-type and resis-

**Table 2**

Comparison of the number of resistant mutations by the PCR-Invader assay with those of sequencing.

	L180M	A181T	T184A	T184F	T184L	S202G	M204I	M204V	M250I	M250L	M250V
Sequencing	55	1	5	1	3	3	38	44	0	6	1
PCR-Invader											
More than 20%	59	0	6	1	3	7	41	46	0	4	3
2–20%	7	14	3	0	1	19	18	13	3	4	5

tant mutations in various ratios, the RED-FOZ value from 10 copies of resistant mutation DNA could be detected to 1:50 relative ratios (Fig. 2). In other words, the RED-FOZ value could detect 2% of resistant mutations in more than 500 copies of wild-type sequences. When the total numbers of DNA templates were increased, the FOZ values in various ratios were the same (not shown).

To validate the PCR-Invader assay, 75 clinical samples from patients were analyzed for resistant mutations by direct sequencing and the PCR-Invader assay. All of the resistant mutations found by direct sequencing were also detected by the PCR-Invader assay. Moreover, the PCR-Invader assay detected low levels of resistant mutations that were not found by direct sequencing. In particular, a high detection rate was found for rtS202G (direct-sequencing, 4.0%; PCR-Invader assay, 34.7%). The PCR-Invader assay showed that 50.6% of the samples were positive for ETV resistant mutations (rtL180M + rtM204V and mutations at rtT184 and/or rtS202 and/or rtM250), while by direct sequencing, mutant variants were only 20% of these. To confirm the existence of resistant variants in the samples scored positive by the PCR-Invader assay, but negative by direct sequencing, cloning sequencing was performed (Table 3). It would be difficult to accurately predict the kinetics of the minor resistant variants that were detected by the PCR-Invader assay. However, the appearance of minor resistant variants presents the risk of virologic rebound. If measurements had been performed regularly after the minor resistant variants were detected, virologic rebound might have been detected earlier. Monitoring the kinetics of the resistant variants will be beneficial for following treatments for patients with HBV infections.

In summary, early detection and monitoring of resistance variants are very important for treating HBV infection. The PCR-Invader assay is a rapid, accurate, and inexpensive method for detecting resistant mutations of HBV. Furthermore, this comparative semi-quantitative assay based on the PCR-Invader assay will be useful for testing simultaneously patients with multiple HBV resistant mutations in a clinical setting.

## References

- Degertekin, B., Hussain, M., Tan, J., Oberhelman, K., Lok, A.S., 2008. Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v.3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance. *J. Hepatol.* 50, 42–48.
- Germer, J.J., Majewski, D.W., Yung, B., Mitchell, P.S., Yao, J.D., 2006. Evaluation of the invader assay for genotyping hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 44, 318–323.
- Hashimoto, Y., Suzuki, F., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H., Hosaka, T., Akuta, N., Kobayashi, M., Saito, S., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Arase, Y., Ikeda, K., Kumada, H., 2010. Clinical and virological effects of long-term (over 5 years) lamivudine therapy. *J. Med. Virol.* 82, 684–691.
- Ke, S.H., Madison, E.L., 1997. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube megaprimer PCR method. *Nucleic Acids Res.* 25, 3371–3372.
- Lee, Y.S., Suh, D.J., Lim, Y.S., Jung, S.W., Kim, K.M., Lee, H.C., Chung, Y.H., Lee, Y.S., Yoo, W., Kim, S.O., 2006. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology* 43, 1385–1391.
- Libbrecht, E., Doutreligne, J., Van De Velde, H., Yuen, M.F., Lai, C.L., Shapiro, F., Sablon, E., 2007. Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic hepatitis B virus-infected patients during long-term lamivudine treatment assessed by a line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3935–3941.
- Locarnini, S., 2008. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol. Int.* 2, 147–151.
- Lyamichev, V.I., Kaiser, M.W., Lyamicheva, N.E., Vologodskii, A.V., Hall, J.G., Ma, W.P., Allawi, H.T., Neri, B.P., 2000. Experimental and theoretical analysis of the invasive signal amplification reaction. *Biochemistry* 39, 9523–9532.
- Manigold, T., Rehmann, B., 2003. Chronic hepatitis B and hepatocarcinogenesis: does prevention of “collateral damage” bring the cure? *Hepatology* 37, 707–710.
- Mashima, Y., Nagano, M., Funayama, T., Zhang, Q., Egashira, T., Kudho, J., Shimizu, N., Oguchi, Y., 2004. Rapid quantification of the heteroplasmy of mutant mitochondrial DNAs in Leber’s hereditary optic neuropathy using the Invader technology. *Clin. Biochem.* 37, 268–276.
- Suzuki, F., Tsubota, A., Arase, Y., Suzuki, Y., Akuta, N., Hosaka, T., Someya, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Ikeda, K., Kobayashi, M., Matsuda, M., Satoh, J., Takagi, K., Kumada, H., 2003. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology* 46, 182–189.
- Suzuki, F., Akuta, N., Suzuki, Y., Yatsuji, H., Sezaki, H., Arase, Y., Hirakawa, M., Kawamura, Y., Hosaka, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Ikeda, K., Kobayashi, M., Watahiki, S., Kumada, H., 2010. Efficacy of switching to entecavir monotherapy in Japanese lamivudine-pretreated patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 (May (5)), 892–898.
- Tadokoro, K., Kobayashi, M., Yamaguchi, T., Suzuki, F., Miyauchi, S., Egashira, T., Kumada, H., 2006. Classification of hepatitis B virus genotypes by the PCR-Invader method with genotype-specific probes. *J. Virol. Methods* 138, 30–39.
- Tenney, D.J., Rose, R.E., Baldick, C.J., Levine, S.M., Pokornowski, K.A., Walsh, A.W., Fang, J., Yu, C.F., Zhang, S., Mazzucco, C.E., Eggers, B., Hsu, M., Plym, M.J., Poundstone, P., Yang, J., Colonno, R.J., 2007. Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance mutations present. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 902–911.
- Villet, S., Ollivet, A., Pichoud, C., Barraud, L., Villeneuve, J.P., Trépo, C., Zoulim, F., 2007. Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient. *J. Hepatol.* 46, 531–538.
- Yatsuji, H., Suzuki, F., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, Y., Kawamura, Y., Hosaka, T., Kobayashi, M., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., Watahiki, S., Iwasaki, S., Kobayashi, M., Kumada, H., 2008. 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.* 48, 923–931.
- Zhang, X., Liu, C., Gong, Q., Zhang, S., Zhang, D., Lu, Z., Wang, Y., 2003. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 1353–1357.
- Zoulim, F., Locarnini, S., 2009. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* 137, 1593–1608.



## &lt;短 報&gt;

## C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法における NS3-4A プロテアーゼ阻害剤 (Telaprevir) 併用 12 週間治療の ウィルス学的効果の検討

瀬崎ひとみ\*、鈴木 文孝、芥田 憲夫、平川 美晴、川村 祐介  
 八辻 寛美、保坂 哲也、小林 正宏、鈴木 義之、斎藤 聡  
 荒瀬 康司、池田 健次、熊田 博光

緒言：現在、C 型慢性肝炎に対する治療はペグインターフェロン (PEG-IFN) とリバビリンの併用療法が標準治療法となっているが、海外においては新規の抗 HCV 薬である NS3-4A protease inhibitor (Telaprevir) の強力な HCV 増殖抑制作用が報告され<sup>1)</sup>、PEG-IFN とリバビリンとの 3 者併用療法により治療効果が飛躍的に改善することが明らかにされてきている。そこで今回我々は、genotype 1 型、高ウイルス量の C 型慢性肝炎患者に対して PEG-IFN $\alpha$ -2b とリバビリンの併用療法に Telaprevir を併用した 3 者併用 12 週間治療のウィルス学的効果を検討した。

対象と方法：対象は、genotype 1b、高ウイルス量の症例で、当院において 2008 年 5 月から 2008 年 7 月までに PEG-IFN $\alpha$ -2b とリバビリン治療に Telaprevir を併用する 3 者併用 12 週間治療を施行することに同意した初回治療例の 10 例である。男性 4 例、女性 6 例、年齢は 36-64 歳 (中央値 51 歳) であった。Telaprevir は無作為に 2 群に分類され、A 群は 1 回 750 mg、B 群は 1 回 500 mg で 8 時間ごとに 3 回投与された。投与中の HCV RNA の陰性化を TaqMan PCR 法にて評価し、さらに 12 週併用療法終了後 24 週経過観察した時点での完全著効 (SVR) 率を評価した。

結果：治療中および治療終了後の経過を Fig. 1 に示す。12 週間の治療を完遂できたのは 5 例 (50%) であった。4 例はヘモグロビン値の低下、1 例は倦怠感により治療

中止となった。しかしながら、HCV RNA は全例で治療中に陰性化を認め、陰性化時期は 2~5 週 (中央値 2 週) と非常に早期であった。Case 1~5 は 12 週までに中止となったが、このうち 2 週目で陰性化した 3 例は 5 週目、7 週目、10 週目に治療を中止したにもかかわらず SVR となった。Case 6~10 は 12 週間投与を完遂した症例であるが、5 週目で陰性化した 1 例を除き、4 例が SVR に至った。最終的な SVR 率は全体で 7/10 例 (70%) と高率であった。

Telaprevir の用量は A 群 6 例、B 群 4 例に割り付けられた。中止率は両群とも 50% であり、SVR 率は A 群 4/6 例 (66.7%)、B 群 3/4 例 (75%) と両群間で治療効果、副作用に差は認めなかった。

男女別にみると、男性 3/4 例 (75.0%)、女性 4/6 例 (66.7%) であり、50 歳以上の女性のみでも、3/3 例 (100%) と高率に SVR を得られた。

HCV core 領域 70 番目のアミノ酸変異の有無から治療効果をみると、wild type の症例は 5/6 例 (83.3%)、mutant type では 2/4 例 (50%) が SVR に至った。

考察：NS3-4A protease inhibitor (Telaprevir) を用いた PEG-IFN とリバビリンとの 3 者併用療法は非常に抗ウィルス効果が高く、以前我々は、genotype 1b 型の慢性肝炎症例に対する 3 者併用 12 週間投与における治療中の HCV RNA 動態を検討し、2 週目で 50%、4 週目で 79%、8 週目で 94%、12 週目で 100% に HCV RNA の陰性化を認めたことを報告した<sup>2)</sup>。今回は、この症例のうち初回治療例について 24 週間の経過観察終了後の最終的な治療成績を検討した。その結果、初回治療例に対しては 12 週間の治療でも SVR に至る症例が 70% に達し、ウィルス排除を目的とした治療として有用であることが判明した。これは欧米の PROVE1<sup>3)</sup> および

虎の門病院肝臓センター

\*Corresponding author: hitomis@mx1.harmonix.ne.jp

§ 利益相反申告：瀬崎ひとみ 株式会社田辺三菱製薬

<受付日2010年2月17日><採択日2010年5月18日>

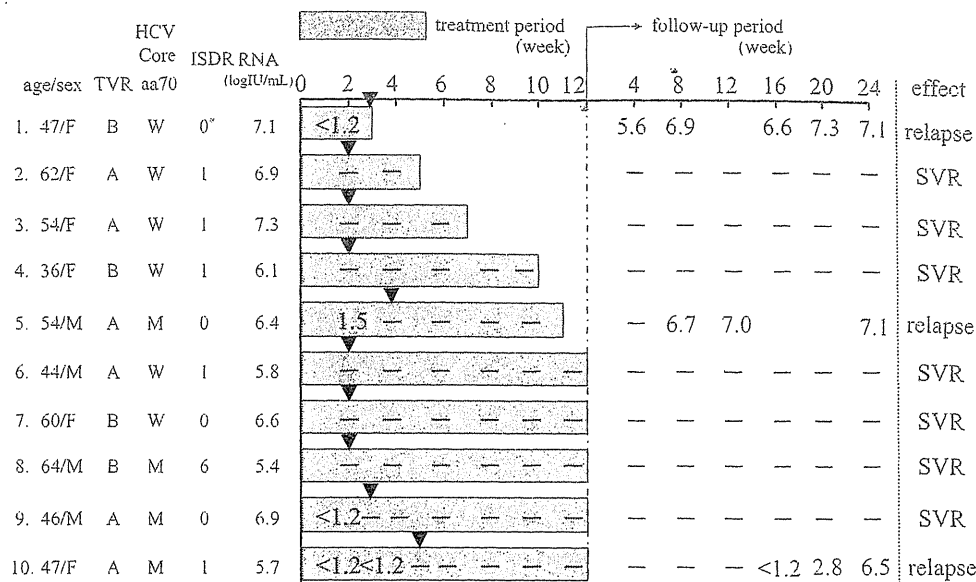


Fig. 1 Clinical course and dynamics of HCV RNA during and after 24 weeks of the triple treatment with telaprevir, pegylated interferon and ribavirin. TVR, telaprevir; A, 2250 mg/day; B, 1500 mg/day; W, wild type; M, mutant type; ISDR, interferon sensitivity determining region; \* Numbers of amino acids substitutions in ISDR is shown. Arrowheads show the time of HCV RNA loss from the serum.

PROVE2<sup>41</sup>における3剤12週間併用療法の成績(35%と60%)と比較しても良好な成績であるといえる。欧米では genotype 1a 型の割合が高く、それぞれの対象症例は genotype 1a 型が53%と45%を占めているのが特徴であり、この点が当院の genotype 1b 型の成績と比較しSVR率が低い原因であると考えられる。また、今回の検討ではPEG-IFNとリバビリンの2剤併用療法では治療効果が低いとされる50歳以上の女性においても、全例がSVRに至っており、こういった難治と考えられる症例に対しても治療効果を改善できるものと期待される。

一方、HCV core 領域の70番目のアミノ酸が mutant type の場合、治療中のHCV RNAの陰性化率は良好であるが、12週間の治療では wild type に比較してSVR率が低い可能性が示唆された。以前の我々の検討より、3剤併用療法時の治療早期のHCV RNAの低下に core 領域のアミノ酸変異が関与していることを報告しており<sup>9)</sup>、今回の検討から最終的な治療成績にもHCV core 領域の変異の有無が関与する可能性が考えられる。

Telaprevir を併用した3剤併用療法中における注意点としては、海外からの報告<sup>34)</sup>にもあるように、掻痒、皮疹の出現頻度が約40-50%と高い点である。当院でも、1例全身性の皮疹の出現により治療中止となった症例を

経験した<sup>3)</sup>。また、貧血の出現も2剤の併用療法時に比し多いと報告されており、当院でも今回の検討症例を含めた5例がヘモグロビン値8.5g/dL以下となり、治療中止となったことを報告した。その内3例は5週以内と早期に中止となっており、3剤併用療法時にはヘモグロビンの低下についてより厳重な経過観察が必要であり、早期にリバビリンの減量を考慮する必要があると考えられる。

今回の検討により、genotype 1b 型の初回治療例に対しては、Telaprevir を併用した3剤併用療法は12週間でも治療効果が高いことが示唆された。Telaprevir の用量については、1日2250mg群と1500mg群とで治療効果に差を認めなかったが、最終的な適正用量については現在進行中の12週間の3剤併用療法後さらに12週間PEG-IFNとリバビリンを投与する24週間治療の有効性、安全性の結果をもとに検討されるべきである。また24週併用することにより、50歳以上の女性、HCV core 領域70番目のアミノ酸が mutant type の症例あるいは前治療で無効であった症例など難治と考えられる症例でも治療効果を改善しうるか、さらに詳細な検討が必要であると思われる。

索引用語 : C 型慢性肝炎, リバビリン併用療法,  
NS3-4A プロテアーゼ阻害剤

文献 : 1) Zeuzem S. J Hepatol 2008; 49: 157—159  
2) Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, et al. Hepatol Res  
2009; 39: 1056—1063 3) McHutchison JG,  
Everson GT, Gordon SC, et al. N Engl J Med 2009;  
360: 1827—1838 4) Hezode C, Forestier N,  
Dusheiko G, et al. N Engl J Med 2009; 360: 1839—  
1850 5) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, et al. J  
Med Virol 2010; 82: 575—582

#### 英文要旨

The efficacy of virological response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C treated by NS3-4A protease inhibitor (telaprevir), pegylated interferon and ribavirin for 12 weeks

Hitomi Sezaki\*, Fumitaka Suzuki,  
Norio Akuta, Miharuru Hirakawa,  
Yusuke Kawamura, Hiromi Yatsuji,  
Tetsuya Hosaka, Masahiro Kobayashi,  
Yoshiyuki Suzuki, Satoshi Saitoh,  
Yasuji Arase, Kenji Ikeda,  
Hiromitsu Kumada

We investigated the efficacy of the triple treatment with telaprevir, pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin for 12 weeks in treatment-naïve patients infected with hepatitis C virus (HCV) genotype 1b and high baseline viral loads. All of 10 cases became HCV-RNA negative during treatment. SVR rate attained to a high rate, 70% (7/10). Especially, SVR rate of females over 50 years old attained 100% (3/3). HCV RNA was lost from serum rapidly in patients infected with HCV-1b in high viral loads, and SVR rate of the triple treatment for 12 weeks was high. Our results suggested that triple treatment with telaprevir, PEG-IFN and ribavirin could improve the efficacy in treatment-naïve patients.

**Key words:** chronic hepatitis C,  
interferon plus ribavirin  
combination therapy,  
NS3-4A protease inhibitor

*Kanzo* 2010; 51: 394—396

Department of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan

\*Corresponding author: hitomis@mx1.harmonix.ne.jp

## &lt;短 報&gt;

核酸アナログ未使用の B 型慢性肝炎症例へのエンテカビル治療中に  
rtA181T 変異ウイルスが増殖した 1 症例

八辻 寛美<sup>1)\*</sup> 鈴木 文孝<sup>1)</sup> 平川 美晴<sup>1)</sup> 川村 祐介<sup>1)</sup> 瀬崎ひとみ<sup>1)</sup>  
 保坂 哲也<sup>1)</sup> 芥田 憲夫<sup>1)</sup> 小林 正宏<sup>1)</sup> 鈴木 義之<sup>1)</sup> 斉藤 聡<sup>1)</sup>  
 荒瀬 康司<sup>1)</sup> 池田 健次<sup>1)</sup> 岩崎 里美<sup>2)</sup> 峰田 理恵<sup>2)</sup> 綿引 祥予<sup>2)</sup>  
 小林万利子<sup>2)</sup> 熊田 博光<sup>1)</sup>

緒言：核酸アナログ未使用の B 型慢性肝炎患者へのエンテカビル治療中に、既報のエンテカビル耐性ウイルスが出現していないにもかかわらず、viral rebound を生じた症例を経験したため、報告する。

症例：51 歳女性。1978 年に B 型慢性肝炎と診断され、2008 年 6 月よりエンテカビル (0.5 mg/日) 治療を開始した。治療開始時 HBV-DNA 7.2 log copies/ml, HBeAg 陽性、genotype C であった。2009 年 2 月 HBV-DNA 2.5 log copies/ml まで下がるも、その後 2009 年 4 月 HBV-DNA 6.0 log copies/ml, 8 月 8.2 log copies/ml と viral rebound が出現し、トランスアミナーゼの上昇も認めた (Fig. 1)。

治療開始時および治療中の HBV-DNA polymerase RT 領域のアミノ酸配列の比較検討：患者血清から抽出された HBV-DNA は PCR 法にて増幅したのち、direct sequence 法にて塩基配列を決定した。クローニング解析もあわせて行った。ダイレクトシークエンスでは核酸アナログ未使用であるにもかかわらず、エンテカビル開始時に rtA181T 変異のわずかな混在を認め、クローニング解析では 8.5% (3/35 クローン) に rtA181T 変異を確認した。また治療開始後 15 カ月ではダイレクトシークエンスにて rtA181T 変異の混在の割合が増加しており、クローニング解析にて rtA181T 変異は 39.5% (17/43 クローン) に増加していた。尚、エンテカビル開始時および治療中に rtA181 以外の既報のエンテカビル

耐性に関与するアミノ酸 (rtL180, T184, S202, M204, M250) に変異は認められなかった (Fig. 1)。

考察：今回我々は、エンテカビル投与にて rtA181T 変異が増殖した症例を経験した。本症例はエンテカビル投与中に viral rebound を生じ、その際既報のエンテカビル耐性ウイルスは出現せず、治療開始時よりわずかに認められていた rtA181T 変異ウイルスが増殖していた。クローニング解析にて rtA181T 変異ウイルスは治療開始時 8.5% から治療開始 15 カ月後に 39.5% に増加し、他に有意なアミノ酸変異を認めないことから、rtA181T 変異がエンテカビル耐性に関与している可能性が考えられた。しかし本症例で出現した rtA181T 変異ウイルスのエンテカビル耐性への関与を証明するためには、今後本症例の血清を使用した in vitro の実験にて評価する必要があると考える。また本症例では viral rebound と同時にトランスアミナーゼ上昇も認めたが、軽度上昇にとどまっているため、現在もエンテカビル治療を継続し厳重にフォローしている。

本症例は、核酸アナログ未使用の B 型慢性肝炎症例であったにもかかわらず、エンテカビル治療開始前より rtA181T 変異が存在していた。核酸アナログ未使用症例にラミブジン耐性に関与する rtL180M, rtM204V 変異が存在するという報告はあるが、本症例のように rtA181T 変異が核酸アナログ使用前に存在したという報告は過去になく、初めての報告である。

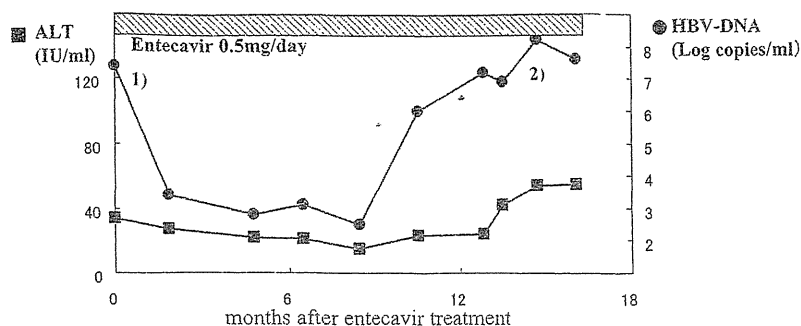
rtA181T 変異は以前よりアデホビル耐性に関与するアミノ酸変異として知られていたが、最近ではラミブジンとアデホビルの交差耐性のある変異であることがわかっている<sup>1)</sup>。このため rtA181T 変異に対してエンテカビルの効果が期待されている。しかし海外からは、ラミブジン耐性ウイルスに対するアデホビル単独治療

1) 虎の門病院肝臓センター

2) 虎の門病院肝臓研究室

\*Corresponding author: h-ooga@mx1.harmonix.ne.jp

&lt;受付日2009年12月25日&gt;&lt;採択日2010年2月25日&gt;



Amino acid(AB033550)	rt181	rt184	rt202	rt204	rt250	No. of clones (Relative rate (%) of clones)
1) At the beginning of ETV						
a) wild	MGVGLSPFLLAQFTSAI		AFSYMDDL		NFMG	32 (91.5%)
b) mutant	MGVGLSPFLLATFTSAI		AFSYMDDL		NFMG	3 (8.5%)
2) 15 months after ETV						
a) wild	MGVGLSPFLLAQFTSAI		AFSYMDDL		NFMG	26 (60.5%)
b) mutant	MGVGLSPFLLATFTSAI		AFSYMDDL		NFMG	17 (39.5%)

Fig. 1 Clinical course and clonal analysis of samples from patient with viral rebound during entecavir therapy

中に耐性ウイルス (rtA181T/V または N236T 変異ウイルス) が出現した症例は、ラミブジン耐性ウイルスのみの症例に比べ、エンテカビル治療におけるウイルス抑制効果が低いという報告があり<sup>2)</sup>、また本症例のようにエンテカビル治療にて rtA181T 変異ウイルスが増加する症例も存在することから、今後 rtA181T 変異ウイルスに対する治療として、エンテカビル以外の核酸アナログ (テノフォビル、その他新規薬剤等) の有効性も検討していく必要があると考えられる。

索引用語：エンテカビル、耐性ウイルス、rtA181T

文献：1) Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, et al. *J Hepatol* 2008; 48: 923—931 2) Shim JH, Suh DJ, Kim KM, et al. *Hepatology* 2009; 50: 1064—1071

英文要旨

Increase of rtA181T mutant strains during entecavir therapy for a patient with chronic hepatitis B virus infection

Hiromi Yatsuji<sup>1)\*</sup>, Fumitaka Suzuki<sup>1)</sup>,  
Miharu Hirakawa<sup>1)</sup>, Yusuke Kawamura<sup>1)</sup>,  
Hitomi Sezaki<sup>1)</sup>, Tetsuya Hosaka<sup>1)</sup>,  
Norio Akuta<sup>1)</sup>, Masahiro Kobayashi<sup>1)</sup>,  
Yoshiyuki Suzuki<sup>1)</sup>, Satoshi Saitoh<sup>1)</sup>,  
Yasuji Arase<sup>1)</sup>, Kenji Ikeda<sup>1)</sup>,  
Satomi Iwasaki<sup>2)</sup>, Rie Mineta<sup>2)</sup>,  
Sachiyo Watahiki<sup>2)</sup>, Mariko Kobayashi<sup>2)</sup>,  
Hiromitsu Kumada<sup>1)</sup>

A 51-year-old Japanese woman with chronic hepatitis B who had never treated with nucleotide analogues was admitted to our hospital and treated with entecavir. In this patient, entecavir successfully reduced the HBV level, but viral and biochemical breakthrough was observed at 10 months after the beginning of therapy. The HBV viral load reached up to 8.2 log copies/ml, but direct sequence analysis showed no LAM and ETV resistant-related mutation (rtT184, S202, M204, M250). Comparison by clonal analysis of samples obtained before and after the viral breakthrough showed the increase of the rtA181T mutant strains (8.5% versus 39.5%). It was considered that the rtA181T mutant

strain in this case might be related to entecavir resistance.

**Key words:** entecavir, drug-resistant mutant, rtA181T

- 1) Department of Hepatology, Toranomon Hospital
  - 2) Department of Research Institute for Hepatology, Toranomon Branch Hospital, Kawasaki
- \*Corresponding author: h-ooga@mx1.harmonix.ne.jp

---

*Kanzo* 2010; 51: 196—198

---

© 2010 The Japan Society of Hepatology

## &lt;速 報&gt;

*IL28B* と HCV Core aa70 置換との関連

小林万利子<sup>1)\*</sup> 鈴木 文孝<sup>2)</sup> 芥田 憲夫<sup>2)</sup> 鈴木 義之<sup>2)</sup> 瀬崎ひとみ<sup>2)</sup>  
 八辻 寛美<sup>2)</sup> 保坂 哲也<sup>2)</sup> 小林 正宏<sup>2)</sup> 川村 裕介<sup>2)</sup> 平川 美晴<sup>2)</sup>  
 荒瀬 康司<sup>2)</sup> 池田 健次<sup>2)</sup> 峰田 理恵<sup>1)</sup> 岩崎 里美<sup>1)</sup> 綿引 祥予<sup>1)</sup>  
 中村 祐輔<sup>3)</sup> 茶山 一彰<sup>4)</sup> 熊田 博光<sup>2)</sup>

はじめに：C型慢性肝炎の治療法であるPEG-IFN/Rivabirin 併用療法のHCV genotype 1bで高ウイルス量症例では、その排除率が50%台である。この難治症例の治療効果予測因子としてHepatitis C virus NS5A領域のInterferon sensitivity-determining regionやCore領域の70番目、91番目のアミノ酸置換が有用であることは周知のごとくであったが、近年アメリカ・日本から宿主側因子として*IL28B*のSNPsがPEG-IFN/Rivabirin 併用療法の治療効果予測として有用であると報告<sup>1)~5)</sup>されている。今回我々は、C型慢性肝炎患者のHCV Core aa70と*IL28B*を測定し性差との関連性を検討した。

対象と方法：1997年から2005年までに虎の門病院倫理委員会及びヒトゲノム委員会で承認された同意書を得た患者291人のchromosome 19上の*IL28B*近傍の2つのSNPs (rs8099917 (T/G), rs12979860 (C/T))とHCV Core領域aa70を測定したHCV genotype 1bとした。内訳は、男性177人(年齢：21-82(中央値56歳)、女性114人(年齢：37-82(中央値61)歳)であった。

*IL28B*のSNPs (rs8099917, rs12979860)のタイピングはInvador assay, Taqman assayまたはdirect sequencing法にて決定した。rs8099917は290例、rs12979860は289例のタイピング可能であった。HCV Core領域aa70の測定は、PCR-direct sequence法にて測定した。性別とSNPの遺伝子型を検討した。

- 1) 虎の門病院肝臓研究室
- 2) 虎の門病院肝臓センター
- 3) 理化学研究所ゲノム医科学研究センター
- 4) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学

\*Corresponding author: vj7m-kbys@asahi-net.or.jp  
 <受付日2010年3月10日><採択日2010年5月1日>

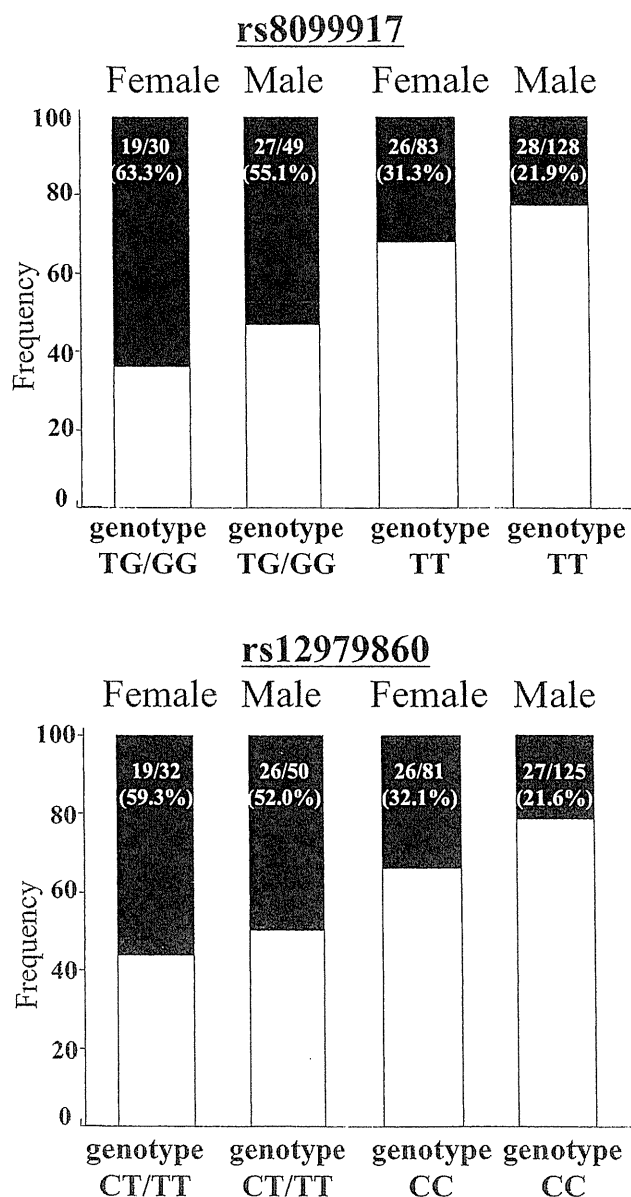


Fig. 1 Relationship between *IL28B* SNPs and amino acid substitution in hepatitis C virus core region in patients with chronic hepatitis C. Black bars represent aa70 mutant (Gln) while white bars represent aa70 wild (Arg)

結果：Core aa70 置換からみた IL28B の SNP と性差の頻度

rs8099917 に関しては、Core aa70 の Mutant(Gln) がもっとも高頻度に見られたのは genotype TG/GG の女性で 19/30 例 (63.3%)。次いで男性の genotype TG/GG で 27/49 例 (55.1%)、女性の genotype TT で 26/83 例 (31.3%) であり、最も低率であったのが男性の genotype TT で 28/128 例 (21.9%) であった (Fig. 1)。

rs12979860 においても同様の傾向を認め、女性の genotype CT/TT で 19/32 例 (59.3%)、男性の genotype CT/TT で 26/50 例 (52.0%) であり、女性の genotype CC で 26/81 例 (32.1%)、男性の genotype CC で 27/125 例 (21.6%) であった (Fig. 1)。

考案：近年、IL28B 領域の SNPs が C 型肝炎ウイルスの自然排除<sup>4</sup>および慢性肝炎の PEG-IFN/Ribavirin 併用療法の治療効果と関連があることが報告された<sup>1)~3)</sup>。我々は、ウイルス側の予測因子である Core aa70 置換について性差を加味して SNP の遺伝子型別にその頻度を解析したところ 2 つの SNP で女性のマイナーアレルホモ接合体及びヘテロ接合体群において Core aa70 (Gln) Mutant の頻度がいずれも 50% 台であった。このことは、高齢の女性は PEG-IFN/Ribavirin 併用療法の治療効果が低い傾向を示すことなんらかの関連が推測され、女性において Core aa70 は、経過観察中にメジャークローンとマイナークローンが入れ代わる可能性が示唆された。今後、治療効果予測として宿主側因子の一つである IL28B の SNPs と Core aa70 置換の組み合わせにより、より有効な治療効果予測が可能になると思われた。

索引用語：C 型慢性肝疾患、IL28B、コア領域

文献：1) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Nature 2009; 461: 399—401 2) Suppiash V, Moldovan M, Ahlenstirnl G, et al. Nat Genet 2009; 41: 1100—1104 3) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Nat Genet 2009; 41: 1105—1109 4) Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Nature 2009; 461: 798—801 5) Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Gastroenterology 2010 (in press)

## 英文要旨

### Relationship between SNPs in the IL28B region and amino acid substitutions in HCV core region in Japanese patients with chronic hepatitis C

Mariko Kobayashi<sup>1)\*</sup>, Fumitaka Suzuki<sup>2)</sup>,  
Norio Akuta<sup>2)</sup>, Yoshiyuki Suzuki<sup>2)</sup>,  
Hitomi Sezaki<sup>2)</sup>, Hiromi Yatsuji<sup>2)</sup>,  
Tetsuya Hosaka<sup>2)</sup>, Masahiro Kobayashi<sup>2)</sup>,  
Yusuke Kawamura<sup>2)</sup>, Miharu Hirakawa<sup>2)</sup>,  
Yasuji Arase<sup>2)</sup>, Kenji Ikeda<sup>1)</sup>,  
Rie Mineta<sup>1)</sup>, Satomi Iwasaki<sup>1)</sup>,  
Sachiyo Watahiki<sup>1)</sup>, Yusuke Nakamura<sup>3)</sup>,  
Kazuaki Chayama<sup>4)</sup>, Hiromitsu Kumada<sup>2)</sup>

IL28 locus polymorphisms have been reported to affect PEG-IFN plus ribavirin combination therapy for patients with genotype 1b hepatitis C virus (HCV) infection. We examined a relationship between IL28B SNPs (rs8099917 and rs12979860) and amino acid substitutions in core region of HCV in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. In each SNP, frequency of core aa 70 mutation was higher rate in female patients carrying minor allele than in male or female patients carrying no minor allele. Measurement of IL28B and Core aa70 before treatment is useful in PEG-IFN plus ribavirin therapy.

**Key words:** IL28B, HCV, core region

Kanzo 2010; 51: 322—323

- 1) Department of Research Institute for Hepatology, Toranomon Hospital, Kawasaki, Japan
- 2) Department of Hepatology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan
- 3) Laboratory for Molecular Medicine, Human Genome Center, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan
- 4) Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

\*Corresponding author: vj7m-kbys@asahi-net.or.jp



## 今月のテーマ ● B 型慢性肝炎に対する最新の治療

### ラミブジンとアデホビル併用不応例に対する アデホビルとエンテカビル併用療法

小 関 至 木 村 睦 海 荒 川 智 宏  
中 島 知 明 桑 田 靖 昭 赤 池 淳  
大 村 卓 味 佐 藤 隆 啓 狩 野 吉 康  
豊 田 成 司<sup>1)</sup>

要旨：ラミブジン（LAM）とアデホビル（ADV）併用療法を12カ月以上行い、HBV DNAが3log copies/ml以上を示したB型慢性肝疾患18例を対象とし、48週以上ADVとエンテカビル（ETV）の併用療法を行いウイルス動態についての検討を行った。LAM耐性例、ADV耐性例、ETV耐性例、多剤耐性例はそれぞれ100%、27.8%、33.3%、55.6%であった。平均HBV DNAはベースラインで4.1log copies/mlより48週の時点で2.9log copies/mlと低下した。ETV耐性を有する症例でHBV DNA減衰量は低下した。本併用療法による副作用は出現せず、48週の経過で新たに獲得したアナログ耐性は認めなかった。テノホビル（TDF）が使用できない本邦の現状ではLAMとADV併用不応例に対して、ADVとETV併用療法は試みるべき治療と思われた。

索引用語：ラミブジン、アデホビル、エンテカビル、B型肝炎ウイルス、耐性変異

#### はじめに

B型肝炎ウイルスによる持続感染の患者は世界で約3億5千万人いるといわれており<sup>1)</sup>、このウイルスによる持続感染はしばしば肝硬変、肝不全を惹起し、肝細胞癌の発生の原因となる<sup>2)</sup>。インターフェロン（interferon；IFN）製剤はB型肝炎ウイルスの増殖を抑制し、肝炎の鎮静に有効であるが、その効果は限定的であり、ペグインターフェロン（pegylated IFN；PEG-IFN）は30～40%の患者でsustained responseを達成するとされている<sup>3,4)</sup>が、本邦では現在治験中である。核酸アナログ製剤はB型肝炎ウイルスのDNAポリメラー

ゼを抑制してDNA合成を阻害し、ウイルス増殖を抑える薬剤であり、血液生化学検査値、肝組織所見の改善を促す<sup>5,6)</sup>。長期の核酸アナログ投与は肝硬変の進展や肝細胞癌の発生を抑制し、長期予後を改善する可能性が指摘されている<sup>7)</sup>。一方で長期に及ぶ核酸アナログ投与は薬剤に対する変異株の発生を促し、しばしば、ウイルス学的ブレイクスルーを引き起こす<sup>8)</sup>。実際に長期のラミブジン（lamivudine；LAM）投与は高率にLAM耐性ウイルスの出現を促した<sup>8,9)</sup>。近年登場した新規の核酸アナログ製剤であるエンテカビル（entecavir；ETV）はLAMと比較して耐性ウイルス

1) 札幌厚生病院第3消化器科

Efficacy of entecavir and adefovir combination therapy in patients with chronic hepatitis B refractory to lamivudine and adefovir combination therapy

Itaru OZEKI, Mutsuimi KIMURA, Tomohiro ARAKAWA, Tomoaki NAKAJIMA, Yasuaki KUWATA, Jun AKAIKE, Takumi OHMURA, Takahiro SATO, Yoshiyasu KARINO and Joji TOYOTA<sup>1)</sup>

1) Department of Hepatology, Sapporo Kosei General Hospital

Corresponding author：小関 至 (iozeki@ja-hokkaidoukouseiren.or.jp)

Table 1. 背景因子

性別		男性：13 女性：5
年齢（歳）	Mean +/- SD	59.6 +/- 9.0
肝硬変（あり）	(No. [%])	10 (55.6)
肝癌既往（あり）	(No. [%])	5 (27.8)
LAM+ADV 治療期間（月）	Mean +/- SD	29.1 +/- 13.1
HBV genotype		Bj：1 C：17
HBV DNA (log <sub>10</sub> copies/ml)	Mean +/- SD	4.10 +/- 1.18
HBeAg (+)	(No. [%])	13 (72.2)
ALT (IU/L)	Mean +/- SD	35.9 +/- 17.7
LAM 耐性	(No. [%])	18 (100)
ADV 耐性	(No. [%])	5 (27.8)
ETV 耐性	(No. [%])	6 (33.3)
多剤耐性	(No. [%])	10 (55.6)

の出現が少なく、抗ウイルス作用が強いことがいくつかの臨床試験で明らかとされた<sup>10)~12)</sup>。本邦においても ETV は 2007 年の承認後 LAM に代わり第一選択の核酸アナログ製剤となった。しかし、既に世界中で多くの LAM 耐性患者を認めており、これらの症例に対して 2009 年の米国肝臓病学会 (American Association for the Study of Liver Disease ; AASLD) はアデホビル (adefovir dipivoxil ; ADV), あるいはテノホビル (tenofovir disoproxil fumarate ; TDF) の LAM との併用投与、あるいは emtricitabine (FTC) と TDF の併用投与への切り替えを推奨した<sup>13)</sup>。同様にヨーロッパ肝臓病学会 (European Association for the Study of the Liver ; EASL) からは TDF の併用<sup>14)</sup>が、本邦からは ADV の併用が推奨された<sup>15)</sup>。LAM 耐性例に対する LAM と ADV 併用療法 (以下 LAM/ADV 療法) による抗ウイルス効果の発現は緩徐であり、大多数の LAM 耐性患者に有効であるが、少数例で HBV DNA の低下量が不十分であることが報告されている<sup>16)17)</sup>。今回われわれは LAM/ADV 療法不応例に対する ADV と ETV 療法 (ADV/ETV 療法) 48 週の成績を検討したので報告する。

### I 対象と方法

LAM/ADV 療法を少なくとも 1 年以上行い、

HBV DNA が 3log copies/ml (以下 log) 以上を示した 18 例を対象とした。自己免疫性肝炎、アルコール性肝障害、うっ血性肝障害の合併例、C 型肝炎ウイルスあるいはヒト免疫不全ウイルスの併発例、黄疸・腹水・脳症・消化管出血をともなう患者は除外した。18 例中 6 例は LAM 耐性に対する ETV 投与の既往を有した。2 名の患者が ADV 投与中に血清クレアチニン上昇をきたしたため、ADV は隔日投与が行われていた。

HBV DNA は TaqMan PCR 法 (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan), 耐性ウイルスの検討は INNO-LiPA HBV DR version 2, version 3 (Innogenetics Gent, Belgium) を用いた<sup>18)</sup>。

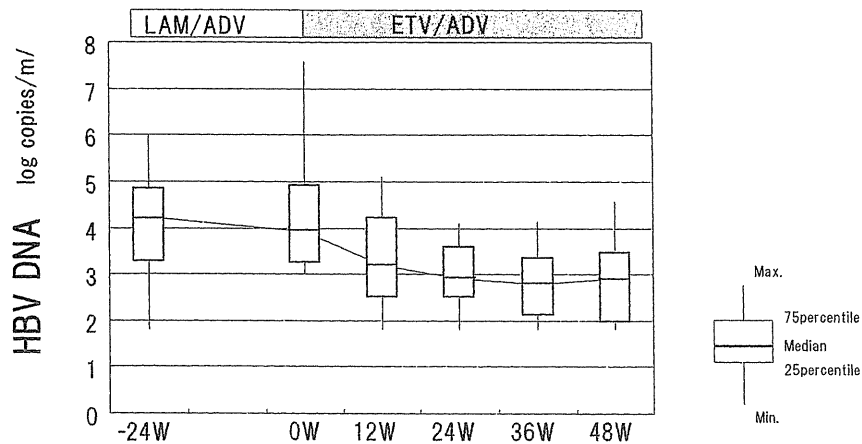
2 群の検定には Student's t test, Mann-Whitney U test, chi-squared test, Fisher's exact test を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### II 結 果

18 例の背景因子を Table 1 に示す。5 例で肝癌の既往を認め、1 例は ADV/ETV 療法中に肝癌を発症したが、肝部分切除あるいは経皮的ラジオ波焼灼療法で根治的な治療を受けた。10 例は代償性肝硬変の状態、遺伝子型では 1 例が Bj 型、17 例が C 型を示し、HBe 抗原陽性は 13 例 (72.2%) であった。LAM 耐性は 18 例全例 (100%), ADV 耐性は 5 例 (27.8%), ETV 耐性

**Table 2.** ベースライン, 48 週の時点における HBV DNA, HBe 抗原, ALT 値の推移と INNO-LiPA 法によるベースラインのアナログ耐性

Case	HBV DNA (log copies/ml)			HBeAg (S/CO)		ALT (IU/L)		Resistance Mutation		
	0W	48W	0W-48W	0W	48W	0W	48W	LAM	ADV	ETV
1	7.6	3.1	4.5	1.7	3.4	74	39	+	+	
2	5.03	3.69	1.34	44	18	32	28	+		
3	3.09	1.8	1.29	—	—	31	16	+		+
4	4.12	2.51	1.61	245	106	27	20	+		+
5	4.9	4.6	0.3	528	359	49	36	+		+
6	3	1.8	1.2	3.7	—	27	28	+	+	
7	5.2	3.53	1.67	—	—	39	47	+		
8	3.87	2.93	0.94	1043	927	15	15	+		
9	4.93	3.91	1.02	87	39	28	25	+		+
10	5.24	4.17	1.07	161	121	48	43	+		
11	4.76	2.64	2.12	1.9	1.3	40	36	+		
12	3.46	3.36	0.1	—	—	37	30	+		
13	3	1.8	1.2	7.5	4.8	10	11	+	+	
14	3.61	2.51	1.1	3.9	3	28	25	+		
15	3.07	1.8	1.27	5.7	5.1	21	22	+		
16	3.96	3.11	0.85	164	94	73	138	+		+
17	3.17	1.8	1.37	—	—	28	42	+	+	
18	3.59	2.89	0.7	—	—	14	16	+	+	+



**Figure 1.** LAM/ADV 療法・ADV/ETV 療法による HBV DNA の推移: HBV DNA はベースライン 4.1log copies/ml から 48 週 2.9log copies/ml と、48 週で 1.2log copies/ml 低下した。

は 6 例 (33.3%), 10 例 (55.6%) は 3 剤耐性を認めた (Table 2).

平均 HBV DNA は ADV/ETV 療法にてベースライン 4.1log, 12 週 3.3log, 24 週 3.0log, 36 週 2.8log, 48 週 2.9log と緩徐に低下した (Figure 1). 18 例中 5 例が 48 週の治療中に 2.1log 未満を呈し

た. 18 例中 13 例は 48 週で 1log 以上の HBV DNA 量の低下を示したが, 残る 5 例の低下量は 1log 未満であった. HBe 抗原陽性例・陰性例で治療 48 週の HBV DNA 低下量に差を認めなかった. アナログ耐性別の治療 48 週での HBV DNA の減衰量は LAM 耐性で 1.2log, LAM 耐性+

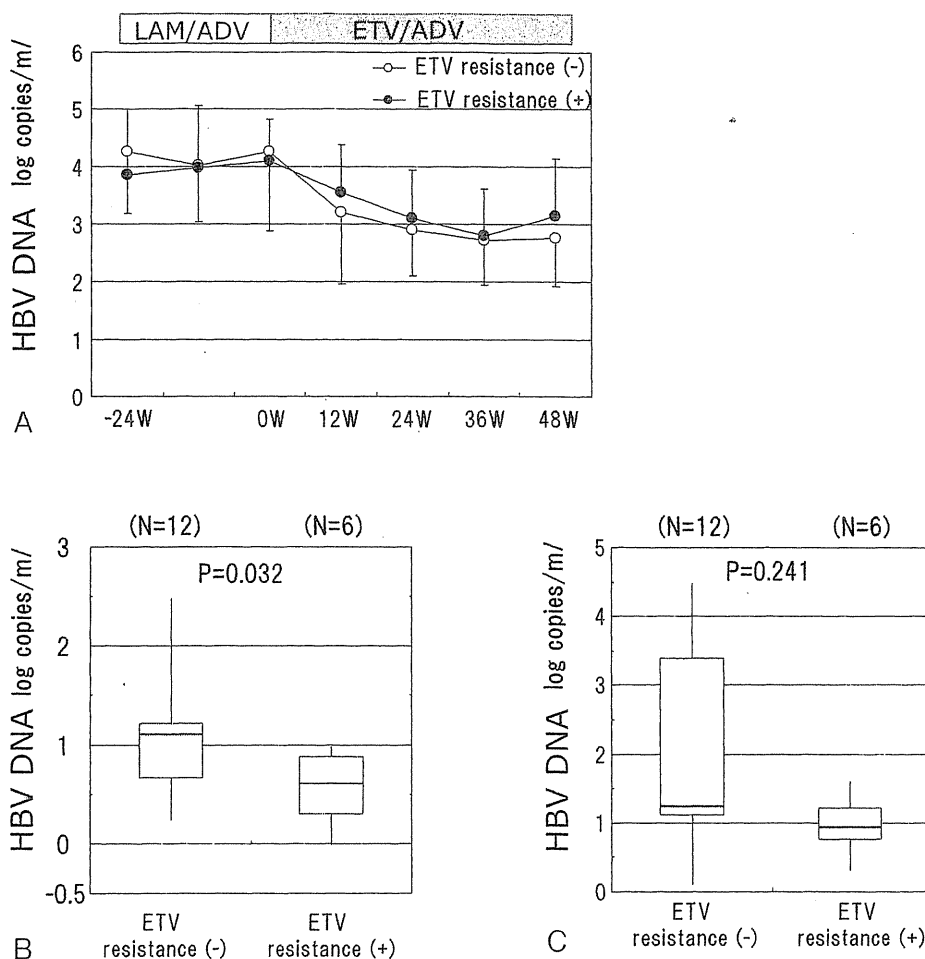


Figure 2. ETV 耐性の有無による LAM/ADV 療法・ADV/ETV 療法による HBV DNA の推移 A) HBV DNA の推移. B) ADV/ETV 療法ベースライン・12 週後の HBV DNA の減衰量の比較. C) ADV/ETV 療法ベースライン・48 週後の HBV DNA の減衰量の比較. ETV 耐性を有する症例で HBV DNA 低下量が乏しい傾向 (12 週  $p=0.032$ , 48 週  $p=0.241$ ) を示した.

ADV 耐性で 2.1log, LAM 耐性+ETV 耐性で 1.0 log, 3 剤耐性で 0.7log であった. ETV 耐性を有する 6 例と有さない 12 例の投与 12 週, 48 週の HBV DNA 減衰量を比較すると, ETV 耐性を有する例で減衰量が低下した (ETV 耐性なし vs ETV 耐性あり 12 週 1.1log vs 0.6log,  $p=0.032$ , 48 週 1.5log vs 1.0log,  $p=0.241$ ) (Figure 2).

ベースラインで HBe 抗原陽性を示した 13 例中 1 例が治療 8 週の時点で陰性となり, 1 例を除くと HBe 抗原量が低下した. ALT についてはベースライン, 治療後で有意な変化を認めなかった (Table 2).

INNO-LiPA 法による耐性部位の検出では, 治療 48 週において, 新たな耐性の出現を認めなかった. 一部の症例でコドン 181 の A/V が A, コドン 236 の T が N に変化するなどの耐性クローンの消失が認められた. ウイルス量の低下にともない 1 例で INNO-LiPA 法による検出が不能となった (Table 3).

本研究中に有害事象の出現による中止例は認めなかった. 2 例が LAM/ADV 療法の時点で腎障害のため既に ADV が隔日投与となっていたが, この 2 例を含めて ADV/ETV 療法に移行後の腎障害の増悪例は認めなかった.