

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業） 分担研究報告書

Invader 法と Direct sequence 法を用いた HCV 薬剤耐性評価に関する検討

研究分担者 清家正隆 大分大学医学部肝疾患相談センター 診療教授

研究要旨：

インターフェロン（IFN）フリーであるプロテアーゼ阻害薬であるアスナプレビルと NS5A 阻害剤であるダクラタスビルの経口 2 剤併用治療が導入され、治療が困難であった IFN 不応例、肝硬変、高齢者、他疾患を有している C 型肝炎が治療可能になった。抗ウイルス活性が強く、比較的副作用も軽微で高率にウイルス排除（SVR）が期待される。一方で薬剤耐性が治療効果に影響することが明らかになっている。薬剤耐性の検査方法はいくつか報告があるが、同一検体を用いて NS5A 蛋白とプロテアーゼ蛋白の薬剤耐性プロファイルである 93 番、31 番、156 番を Invader 法と Direct sequence 法により評価した。NS5A 領域の 93 番、31 番では Invader 法で薬剤耐性が陰性ないし弱陽性であれば Direct sequence 法においても Major peak 陽性は少なく、Invader 法で陽性であれば Direct sequence 法でも薬剤耐性がみられる。しかし NS3/4 領域の 168 番では Invader 法で陰性であるにもかかわらず、Direct sequence 法で陽性であるケースがみられ、注意を要する。両方の比較から、薬剤耐性については検査法の特徴を理解し、判断する必要があることが示唆された。

A. 研究目的

はじめに：ダクラタスビル、アスナプレビル経口 2 剤併用療法では薬剤耐性が治療効果に影響するため、薬剤耐性を評価し治療導入することが推奨されている。現在、Invader (Inv) 法と Direct sequence (DS) 法で評価されているが、耐性評価に discrepancy がみられる。両評価法による相違と問題点について検討した。

B. 研究方法

対象 2014 年 8 月から 11 月までに治療導入を考慮した 110 例（男性 48 例、女性 62 例、平均年齢 72.3 歳）を対象として、Invader 法で 110 例を評価し、NS3/4 領域 168 番、NS5A 領域 93 番、31 番については同一検体で Direct sequence 法で解析し、薬剤耐性を比較検討した。

血液検体より RNA を抽出し、増幅後 PCR Invader 法（BML）により測定した。相対定量で 1% 以下の耐性を陰性、1-20% を弱陽性、20% 以上を陽性とした。Direct sequence 法は Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer を用いて解析し、Major peak を陽性とした。統計学的検討は 二乗検定、Mann-Whitney U 検定を用いた。

（倫理面への配慮）

臨床研究審査委員会の承認後、書面にて同意を得て行なった。

C. 研究結果

1. Invader 法による薬剤耐性変異の割合（表 1）
Invader 法では陽性率は、Y93 変異陽性は 21/110 (19%)、弱陽性 19%、陰性 61% であった。L31 変異陽性は 3/110 (2.7%)、D168 変異陽性は

3/110 (2.7%) であった。

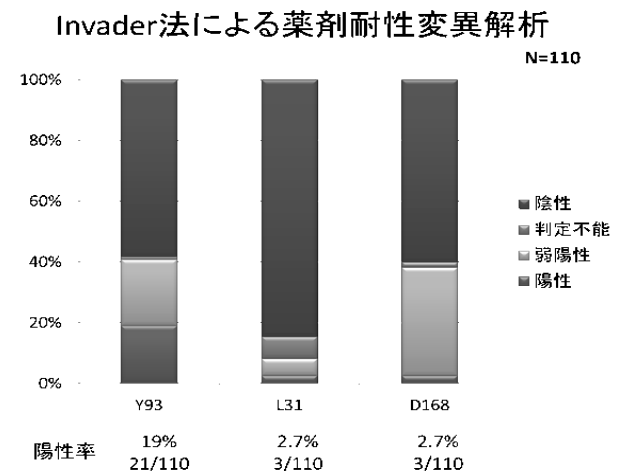


図 1. Invader 法による Y93、L31、D168 の薬剤耐性を示す。

2. Direct sequence との比較（表 1）

Y93 変異のうち、Invader 法で陰性症例は Direct sequence 法ではすべて陰性であった。弱陽性のうち 2 例は minor 陽性で残りは陰性であった。Invader 法で陽性例のうち、3 例は Direct sequence 法で陰性であった。L31 についても同様の所見であり、Invader 法で陰性、弱陽性で major 陽性はみられなかった。一方、D168 については、Invader 法で陰性例で、2 例 Major Peak がみられた。

表1 Invader(Inv)法とDirect sequence (DS)法によるY93、L31、D168による薬剤耐性の比較

Y93				
	Inv 陽性	Inv弱陽性	Inv 陰性	判定不能
DS 陰性	3	16	58	1
DS minor 陽性	5	2	0	0
DS major 陽性	10	0	0	0

L31				
	Inv 陽性	Inv弱陽性	Inv陰性	判定不能
DS 陰性	1	2	82	7
DS minor 陽性	1	1	0	0
DS major 陽性	1	0	0	0

D168				
	Inv 陽性	Inv弱陽性	Inv 陰性	判定不能
DS 陰性	2	30	53	1
DS minor 陽性	0	0	0	0
DS major 陽性	0	1	2	0

この結果、Y93とL31については、Invader法で陰性、ないし弱陽性、であれば、Direct sequence法で陰性であることが多いので、治療対象と考えるとよいと思われる。しかし、D168についてはInvader法陰性であっても、Direct sequence法陽性があり、十分に検証の上、治療導入する必要がある。特にプロテアーゼ阻害剤無効例では、治療導入に際して、耐性変異のチェックをして、治療導入する必要がある。

他の耐性変異プロフィール(V36/T54/Q80/R155/A156/D168/L31/Y93)での評価はInvader法陽性で、Direct sequence法major peak陽性は75%、Invader法弱陽性でDirect sequence法での陽性率は8.7%、Invader法陰性で、Direct sequence法でmajor peak陽性は0.6% minor peak陽性は0.16% Invader法判定不能はDirect sequence法では全例陰性であった。

D. 考察

IFNフリー治療であるNS3/4Aプロテアーゼ阻害剤、NS5A阻害剤の登場により肝炎治療の環境は著しく飛躍した。従来治療IFNによる治療が困難であった肝硬変や高齢者、自己免疫性肝炎の患者にも対象は拡大された。またIFNに不応の患者も高率に治癒することが期待される。

しかし、耐性変異を有する場合は治癒率が低下することから、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤ではD168変異、NS5A阻害剤ではY93、L31の耐性検査が望ましいとされている。現在耐性検査では、Invader法とDirect sequence法があり、その

特徴をよく理解し、治療導入する必要がある。今回、同一の検体を用いて、Invader法とDirect sequence法による測定を行い、比較検討した。Invader法が感度がいいため、Invader法陰性、弱陽性、測定不能は、Direct sequence法では多くは陰性であった。一方D168のみ、Invader法で陰性であるにもかかわらずDirect sequence法で陽性であった。D168については両者の乖離がみられるため、治療導入は注意が必要である。

E. 結論

Invader法とDirect sequence法では耐性変異プロフィールの評価に乖離がみられ注意が必要である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
1. 学会発表
なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について
 - ・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。
 - (2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。
3. 「C. 研究結果」について
 - ・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。
4. その他
 - (1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。
 - (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。