

### Virological response

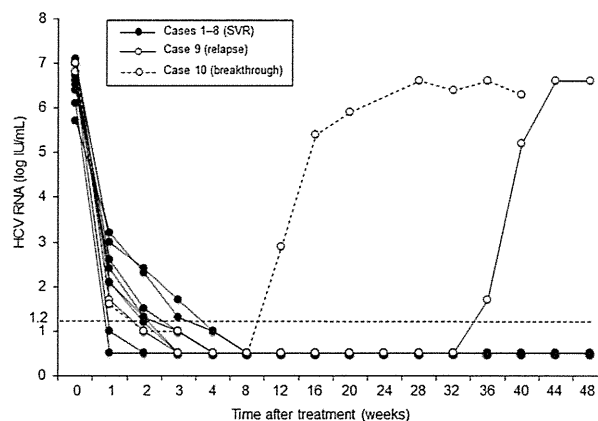
Between weeks 1 and 8 of treatment, serum HCV-RNA titres decreased below the limit of detection in all 10 patients. HCV-RNA titres in 9 of the 10 patients remained undetectable until the end of the treatment, and eight out of nine patients achieved SVR (Fig. 1). In one patient (Case 9), serum HCV-RNA titre rebounded at week 36 (12 weeks after cessation of the treatment) and returned to pretreatment levels. In this case, ultra-deep sequencing showed that 100% of the total reads were the wild type sequence at NS3 aa168, indicating that this amino acid was completely replaced with the ASV-resistant variant D168A by week 40 (16 weeks after cessation of the treatment) (Fig. 2a). 99.1% and 67.5% of the aligned reads showed wild type sequences in NS5A aa31 and 93 before treatment, respectively. These aa were predominantly replaced by DCV-resistant variants; 99.1% of L31M and 96.6% of Y93H.

In Case 10, serum HCV-RNA titre decreased below the detectable limit at week 2 of treatment. However, serum HCV-RNA titre rebounded at week 10, and the treatment was stopped at week 16 (Fig. 1). In this case, ASV-resistant variants were not detected prior to treatment; however, NS3 D168V was enriched at week 10 and increased to 45.7% at week 16 (Fig. 2b). In this case, 99.4% of NS5A Y93H was detected before treatment, and the variants persisted at high frequency during the course of therapy. The L31M variant was not detected before treatment but was detected in up to 99.6% of the sequences at week 10. By week 32 (16 weeks after cessation of the treatment), NS3 aa168 had been completely replaced by wild

type, whereas NS5A aa31 was completely replaced by the DCV-resistant variant.

### DISCUSSION

Drug resistance has been shown to emerge with different classes of DAA regimens. However, the reason why treatment fails in some patients remains unclear. Amino acid substitutions in HCV related proteins that confer resistance



**Fig. 1** Hepatitis C virus (HCV) RNA levels over time for patients treated with daclatasvir and asunaprevir. Serum HCV RNA titres decreased below the detectable limit 4 weeks after the beginning of treatment in all patients. Serum HCV RNA rebounded at 12 weeks after cessation of the treatment in Case 9 (relapse) and at week 12 of the treatment in Case 10 (breakthrough).

**Table 4** Ultra-deep sequence analysis of NS5A amino acid 31 and 93 in 10 patients prior to the start of the combination therapy with asunaprevir and daclatasvir

Case	aa31			aa93		
	Aligned reads	WT (L) (%)	Variant (%)	Aligned reads	WT (Y) (%)	Variant (%)
1	821 229	99.9	–	75 800	28.7	H (71.2)
2	851 400	100	–	217 011	99.7	–
3	1 137 359	99.0	V (1.0)	175 520	0.5	H (99.4)
4	80 535	100	–	451 140	99.8	–
5	2 711 250	99.9	–	469 945	99.8	–
6	757 927	99.9	–	198 881	99.8	–
7	790 076	99.9	–	456 161	99.1	H (0.9)
8	670 404	99.9	–	527 879	99.9	–
9	588 331	99.1	M (0.7)	300 666	67.5	H (32.4)
10	1 436 741	99.7	–	451 138	0.6	H (99.4)

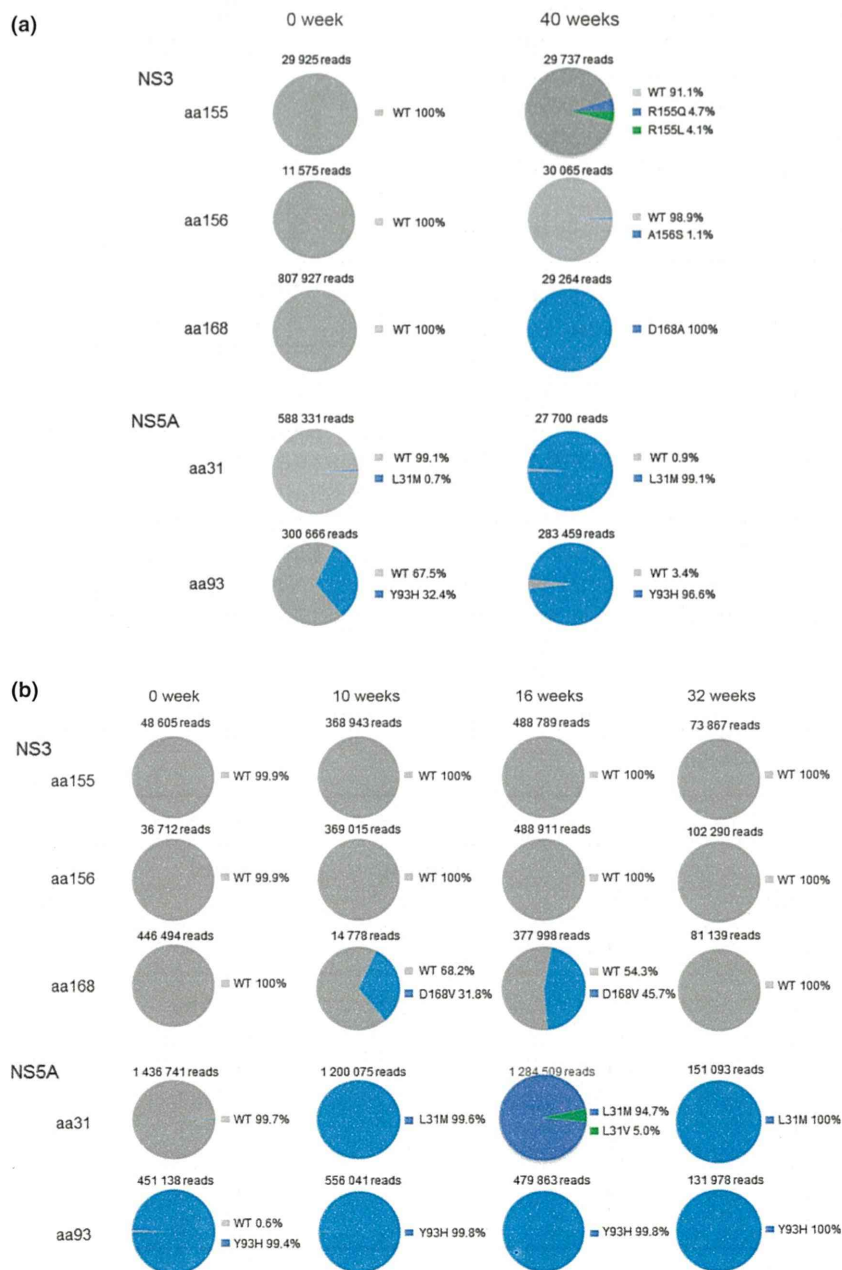
Substituted amino acids are shown by standard single-letter codes. Dashes indicate amino acid substitutions with a frequency less than 0.3% of the aligned reads at that position; Aligned reads: the number of reads that overlap the given codon position in the reference alignment; WT, wild type.

to DAAs can exist at low frequency prior to antiviral treatment with DAAs. Enrichment of variants during therapy has been reported, although monitoring changes in variant frequency using ultra-deep sequencing is not commonly performed. HCV is an error-prone RNA virus in which substitutions frequently occur throughout the HCV genome [27,28], and drug-resistant variants are sometimes present as minor populations in patients who have never been exposed to DAAs [29].

In this study, ultra-deep sequence analysis detected DCV-resistant variants in 5 (50%) patients before treatment. In

recent Japanese studies, the prevalence of NS3/4A protease inhibitor- and NS5A inhibitor-resistant variants in HCV genotype 1b-infected patients was reported to be approximately 4.9% and 11–23%, respectively, by direct sequence analysis, [16,17,29].

Patients with no ASV-resistant variants but with NS5A L31M/S and a high frequency of Y93H variants (32.4% and 99.4%) resulted in the development of double resistance variants, indicating that pre-existence of a high frequency of Y93H variants might be associated with relapse or viral breakthrough with ASV and DCV combination



**Fig. 2** Time courses of the amino acid frequencies at R155, A156 and D168 in the NS3 region and at L31 and Y93 in the NS5A region by ultra-deep sequencing in Case 9 (a) and Case 10 (b).

treatment. However, Case 3 achieved SVR despite a pre-existing NS5A L31V variant and a high frequency (99.4%) Y93H variant. These results suggest that pre-existing DCV-resistant variants might be associated with viral breakthrough for DCV and ASV combination treatment; however, identifying pre-existing resistant variants by ultra-deep sequence seems to have limited utility in predicting the outcome of therapy.

Karino *et al.* [17] reported a relationship between pre-existing drug-resistant variants by direct sequencing analysis and clinical antiviral responses to DCV and ASV combination treatment. McPhee *et al.* [30] also reported that six of seven genotype 1a HCV-infected patients treated with ASV and DCV developed viral breakthrough even though no resistance variants were detected at baseline by population sequencing analysis. Ultra-deep sequence analysis may permit more detailed analysis of resistance variants.

In Case 9, although ASV-resistant variants had not been detected before treatment, the frequency of D168A had reached 100% by 16 weeks after cessation of treatment, indicating that the wild type amino acid had been completely replaced. Similarly, in Case 10, the frequency of the D168V variant had already reached 31.8% by week 10, and the frequency increased to 45.7% by week 16. In both patients, NS5A aa31 and 93 were predominantly replaced by DCV-resistant variants. In Case 10, NS3 aa168 had completely returned to wild type 16 weeks after cessation of the treatment, while NS5A aa31 was completely replaced by the DCV-resistant variant. We previously reported that TVR-resistant variants have reduced replication capacity and are easily replaced by wild type when TVR is not

present [25]. Karino *et al.* reported that DCV-resistant substitutions persisted through 48 weeks post-treatment, whereas ASV-resistant substitutions were no longer detectable by direct sequence analysis in viral breakthrough patients treated with DCV and ASV. Long-term follow-up of these variants by ultra-deep sequence analysis is required to fully understand their fitness vs wild type sequence. The analysis of a larger number of patients is now ongoing.

In conclusion, 10 patients with HCV genotype 1b infection were treated with ASV and DCV combination treatment. This treatment is expected to improve the SVR rate greatly, but viral breakthrough might develop in some patients with the emergence of ASV- and DCV-resistant variants. Patients with a high frequency of pre-existing DCV-resistant variants might be more susceptible to viral breakthrough during combination therapy, although it remains to be seen whether ultra-deep sequencing analysis of resistance variants prior to treatment can effectively predict treatment outcome.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Rie Akiyama and Yoko Matsumoto for their expert technical help. This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Labor, Health and Welfare.

#### FINANCIAL SUPPORT

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

#### REFERENCES

- 1 Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E *et al.* Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 1990; 12: 671–675.
- 2 Niederau C, Lange S, Heintges T *et al.* Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology* 1998; 28: 1687–1695.
- 3 McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC *et al.* Telaprevir with peg-interferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1827–1838.
- 4 Zeuzem S, Andreone P, Pol S *et al.* Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 2417–2428.
- 5 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for patients with chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975–982.
- 6 Hoofnagle JH, Ghany MG, Kleiner DE *et al.* Maintenance therapy with ribavirin in patients with chronic hepatitis C who fail to respond to combination therapy with interferon alfa and ribavirin. *Hepatology* 2003; 38: 66–74.
- 7 Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2011; 364: 2405–2416.
- 8 Hézode C, Forestier N, Dusheiko G *et al.* Telaprevir and peg-interferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1839–1850.
- 9 Kumada H, Toyota J, Okanoue T *et al.* Telaprevir with peg-interferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol* 2012; 56: 78–84.
- 10 Hayashi N, Okanoue T, Tsubouchi H *et al.* Efficacy and safety of telaprevir, a new protease inhibitor, for difficult-to-treat patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2012; 19: e134–e142.
- 11 Gao M, Nettles RE, Belema M *et al.* Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010; 465: 96–100.
- 12 Arima N, Kao CY, Licht T *et al.* Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 2012; 276: 12675–12684.

- 13 McPhee F, Sheaffer AK, Friborg J *et al.* Preclinical profile and characterization of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor asunaprevir (BMS-650032). *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 5387–5396.
- 14 Soriano V, Peters MG, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 313–320.
- 15 Chayama K, Takahashi S, Toyota J *et al.* Dual therapy with the NS5A inhibitor, daclatasvir, and the NS3 protease inhibitor, asunaprevir, in HCV genotype 1b-infected null responders. *Hepatology* 2012; 55: 742–748.
- 16 Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F *et al.* Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options. *J Hepatol* 2013; 58: 655–662.
- 17 Karino Y, Toyota J, Ikeda K *et al.* Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol* 2013; 58: 646–654.
- 18 Nasu A, Marusawa H, Ueda Y *et al.* Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. *PLoS ONE* 2011; 6: e24907.
- 19 Ninomiya M, Ueno Y, Funayama R *et al.* Use of illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 857–866.
- 20 Lauck M, Alvarado-Mora MV, Becker EA *et al.* Analysis of hepatitis C virus intrahost diversity across the coding region by ultradeep pyrosequencing. *J Virol* 2012; 86: 3952–3960.
- 21 Akuta N, Suzuki F, Seko Y *et al.* Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Med Virol* 2013; 85: 1028–1036.
- 22 Bronowicki JP, Pol S, Thuluvath PJ *et al.* BMS-650032, an NS3 inhibitor, in combination with peginterferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naive subjects with genotype 1 chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2011; 54: S472.
- 23 Mori N, Imamura M, Kawakami Y *et al.* Randomized trial of high-dose interferon-alpha-2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C: Correlation between amino acid substitutions in the core/NS5A region. *J Med Virol* 2009; 81: 640–649.
- 24 Abe H, Ochi H, Maekawa T *et al.* Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol* 2010; 53: 439–443.
- 25 Hiraga N, Imamura M, Abe H *et al.* Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology* 2011; 54: 781–788.
- 26 Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* 2009; 25: 1754–1760.
- 27 Kuntzen T, Timm J, Berical A *et al.* Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naive patients. *Hepatology* 2008; 48: 1769–1778.
- 28 Lu L, Mo H, Pilot-Matias TJ *et al.* Evolution of resistant M414T mutants among hepatitis C virus replicon cells treated with polymerase inhibitor A-782759. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1889–1896.
- 29 Suzuki F, Sezaki H, Akuta N *et al.* Prevalence of hepatitis C virus variants resistant to NS3 protease inhibitors or the NS5A inhibitor (BMS-790052) in hepatitis patients with genotype 1b. *J Clin Virol* 2012; 54: 352–354.
- 30 McPhee F, Hernandez D, Yu F *et al.* Resistance analysis of hepatitis C virus genotype 1 prior treatment null responders receiving daclatasvir and asunaprevir. *Hepatology* 2013; 58: 902–911.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1:** Relationship between coverage and frequency of nucleotide substitutions in deep sequencing

target regions in the control plasmid.

**Table S1:** Nucleotide frequencies from the plasmid control sequence.

**Table S2:** Codon frequencies from the plasmid control sequence.

**Table S3:** Codon frequencies in patients prior to therapy.

**Table S4:** Amino acid frequencies in patients prior to therapy.

## 第1部 Overview

## 2. 肝炎の臨床

## 2 C型肝炎治療の現状と新展開

### —3 剤併用療法, DAA 経口薬など

須田 剛生, 坂本 直哉

## point

- ◆ HCV プロテアーゼ阻害薬と Peg-IFN+RBV 併用療法により高いウイルス学的著効率が得られるようになった。
- ◆ 現在, IFN-free の DAA 経口薬のみ臨床試験が数多く行われており, 高い著効率が報告されている。
- ◆ DAA を使用した治療においては, 耐性ウイルスが問題となる。
- ◆ 現在の肝機能, 前治療の反応性, 発癌リスク, 年齢また耐性ウイルスなどを考慮して症例ごとに適切な時期に, 適切な治療を選択することが求められる。

## はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) は, 国内に150万人以上の感染者が存在し日本における慢性肝疾患・肝臓の主因である。慢性C型肝炎に対する抗ウイルス療法は, 1992年よりインターフェロン (IFN) 単独療法が開始され, 続いてリバビリン (RBV) が導入され, さらに2004年にPEG化インターフェロン (Peg-IFN) 製剤の長期投与が可能となり, ウイルス排除率は50%にまで向上した (図1-2-5)。しかしながら, IL28B 遺伝子多型により規定される IFN 不応症例が存在することが明らかとなり, IFN 以外の治療薬の登場が期待されていた。1999年, HCV 発見後長らく存在しなかった *in vitro* での HCV 培養系として Bartenschlager らにより構造蛋白領域を薬剤耐性遺伝子に置き換えた HCV レプリコンが樹

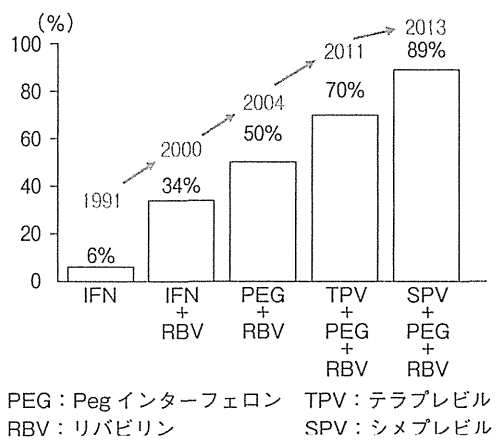


図1-2-5 C型肝炎治療成績の進歩

立され<sup>1)</sup>, 続いて2005年にWakitaらにより劇症肝炎患者より分離されたHCV感染培養系が樹立されると<sup>2)</sup>, ウイルス蛋白を直接標的にしたDAA (Direct Acting Antivirals) 薬剤が開発され急速に臨床試験も多数行われるようになった

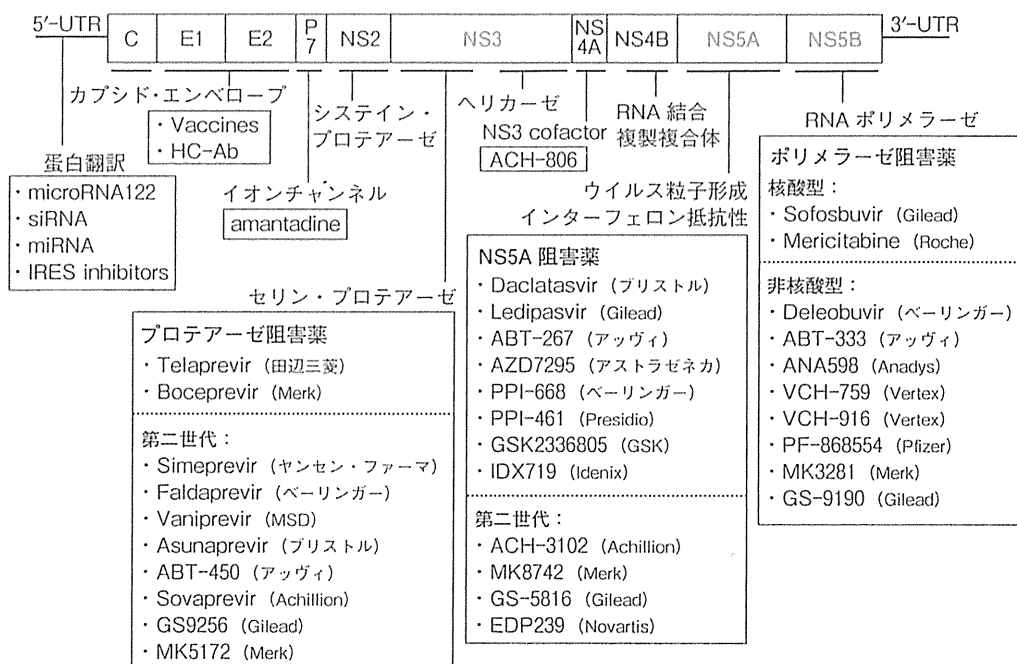


図 1-2-6 HCV ゲノムの構造と DAA (Direct Acting Antivirals)

〔Sakamoto N : J Gastroenterol 2009 ; 44 : 643 より改変引用〕

(図 1-2-6).

本邦においても、2011 年より DAA の一つである (NS3) プロテアーゼ阻害薬であるテラプレビル (Telaprevir ; TPV) と Peg-IFN, RBV 併用療法が開始され高い治療成績を収めたが、重篤な副作用などの問題も認められた。そして 2013 年 12 月より世界に先駆けて本邦において、第二世代のプロテアーゼ阻害薬であるシメプレビル (Simeprevir) が承認され Peg-IFN+RBV 併用療法が開始される。

プロテアーゼ阻害薬以外の DAA の開発や、臨床試験も急速に進展しており、近い将来、本邦においても HCV ポリメラーゼ阻害薬および NS5A 阻害薬が臨床にて使用されることが期待されている。この 1 年間で複数の薬剤が Phase 3 に進んだが、そのほとんどは経口薬併用治療として治験が進められている。今後は、IFN を使用しない複数の DAA の組み合わせによる治療が主流となることが予想される。急速に変化している C 型肝炎治療の現状と今後の展開について概略する。

## I. HCV プロテアーゼ阻害薬テラプレビル/シメプレビル併用 Peg-IFN/RBV 療法

HCV プロテアーゼは、HCV 非構造蛋白の境界を切断する働きを有するため、HCV プロテアーゼの活性を阻害することによりウイルス増殖を抑制することが可能となる。HCV プロテアーゼ阻害薬はその構造と耐性変異のパターンから大きく 2 群に分けられる。一つは、分岐のない直鎖状の分子構造をとるテラプレビル、Boceprevir に代表されるグループで、第一世代のプロテアーゼ阻害薬と呼ばれる。もう一群は、分子内に環状構造 (Macrocyclic) または分岐構造をもつシメプレビルに代表される第二世代プロテアーゼ阻害薬である。

本邦において 2011 年より難治性である Genotype 1 型高ウイルス量症例に対して、第一世代の HCV-NS3/4 プロテアーゼ阻害薬であるテラプレビルと Peg-IFN+RBV 併用療法が臨床にお

いて使用可能となった。本邦における第Ⅲ相試験ではIFN初回投与例に対するSVR (Sustained Virological Response) 率は73%と高い治療効果を認めた。さらに、市販後の全例調査にては80%を超える高いSVR率が報告された<sup>3)</sup>。一方で、今までの既治療では認めなかった重篤な副作用が認められるようになり、そのために治療中止が余儀なくされる症例も認められた。TPV+Peg-IFN+RBV併用療法による重要な副作用は、皮膚症状、貧血、血中クレアチニン増加(腎障害)、高尿酸血症である。とくに皮膚症状はテラプレビル併用療法において特徴的な副作用で、85%の患者に発現し、重症度は2剤併用療法よりも高くステーブンス・ジョンソン症候群(SJS)や薬剤性過敏症候群(DIHS)および粘膜症状を伴う多形紅斑など、重篤な皮疹が1.5%に出現した。そのために、テラプレビル併用療法を行う際には皮膚科専門医との連携のもと厳重な注意が必要である。

2013年12月より世界に先駆けて第二世代のプロテアーゼ阻害薬であるシメプレビルが承認され、PEG-IFN+RBV併用療法が開始される。第二世代プロテアーゼ阻害薬は、血中薬物動態が向上しており1日1回の経口投与で効果が発現し、薬剤相互作用はテラプレビルと比較すると併用禁忌薬が減少し、使いやすい薬剤となっている。副作用に関しても、国内第Ⅲ相試験において対象のPEG-IFN+RBV併用療法と同程度であり高い安全性が確認された<sup>4)</sup>。

本邦におけるIFN初回治療例に対するシメプレビル併用療法のCONCERTO-1試験<sup>4)</sup>では、SVR24は89%と高い奏効率を認めた。また、前治療再燃例においてもSVR24は90%と高い奏効率を認める一方で、前治療無効例においてはSVR率が36~51%と十分とはいえない著効率であった<sup>5)</sup>。

また、治療不応例におけるプロテアーゼ阻害薬耐性ウイルスの出現は92%と高く、そのほとんどが168番のアミノ酸変異であった。治療不成功例に出現した耐性ウイルスが、IFN-freeのDAA

経口治療を行う際に及ぼす影響については今後の検討課題である。さらに現在、シメプレビルに続いて第二世代プロテアーゼ阻害薬MK7009、BI-201335とPeg-IFN+RBVとの3剤併用療法の臨床試験が本邦において進行している。

## II. おもなDAA (Direct Acting Antivirals)

現在、すでに臨床にて使用が開始されているHCVプロテアーゼ阻害薬以外にも複数のクラスのDAAの開発、臨床試験が行われている。プロテアーゼ阻害薬以外のおもなDAAクラスであるNS5A阻害薬、HCVポリメラーゼ阻害薬にて概略する。

### 1. NS5A 阻害薬

NS5A蛋白は、ウイルスの増殖、粒子形成・放出に重要な働きをもつことが報告されており、NS5A阻害薬はウイルスライフサイクルの同部位を阻害することが期待される。NS5A蛋白N末端寄り1/3のDomain 1には、陽性荷電したRNA結合領域が存在するほか、ISDR (Interferon Sensitivity Determining Resion) や、PKR結合ドメインなどIFN応答性を制御しうるエピトープが存在する。NS5A阻害薬であるDaclatasvirはDomain 1に結合する薬剤として設計された薬剤である。NS5A Domain1は比較的Genotype間でも保存された構造となっており、種々のGenotypeのHCVレプリコンに対してpM単位で効果を発揮し、プロテアーゼ阻害薬の作用濃度に比し10~1,000倍の少量で効果を発揮した<sup>6)</sup>。さらに、NS5A阻害薬の耐性獲得変異であるL31V、Y93Hを有するウイルス株にも効果を保持する第二世代NS5A阻害薬(ACH-3102, MK8742, IDX719, GS-5816, EDP239)の臨床開発も進行している。

### 2. ポリメラーゼ阻害薬

HCVのNS5B-RNA依存性RNAポリメラーゼを標的とした薬剤は大きく二つのクラス、すなわ

ち核酸型と非核酸型に分けられる。核酸型はウイルス RNA 合成の基質として NS5B ポリメラーゼに取り込まれ Chain termination を起こすことによりウイルスゲノム増殖を阻害する。そのため、核酸型ポリメラーゼ阻害薬は耐性変異を生じにくく、複数の HCV Genotype に対し活性を有する。非核酸型は NS5B の触媒ドメインに直接結合しポリメラーゼ活性を阻害する。非核酸型ポリメラーゼ阻害薬は大きく4種類が存在し、NS5B ポリメラーゼの異なるエピトープを標的としており、それぞれ固有の薬剤耐性変異を有する。同剤はプロテアーゼ阻害薬同様、投与早期に高率に薬剤耐性変異を生じることが報告されている<sup>7)</sup>。

### Ⅲ. IFN-free DAA 併用療法

前述の多くの DAA は単独投与では治療開始後早期に高率に耐性変異を生じるために、初期にはシメプレビルやテラプレビルなどのように PEG-IFN+RBV 併用療法にアド・オンした3剤併用プロトコルとして進められた。しかしながら、IFN の副作用や、IFN 不応例などが考慮され、IFN 非併用下で標的の異なる複数のクラスの DAA や RBV を併用することで相互の耐性変異ウイルスの出現を抑えつつウイルス排除を狙う“IFN-free” DAA 併用療法の臨床試験が数多く

施行されている。

本邦においても、複数の IFN-free DAA 併用療法の臨床試験が進行中である(表 1-2-1)。もっとも先行しているプロテアーゼ阻害薬 Asunaprevir と NS5A 阻害薬 Daclatasvir 併用試験では、IFN 非併用下で高率に SVR を達成した<sup>8)</sup>。また ABT-450+ABT-267 併用療法, Faldaprevir+Deleobuvir 併用療法ともに海外の第Ⅱ相試験にて 90%を超える SVR 率が報告されている。

また、Sofosbuvir based の治療は現在日本で第Ⅲ相試験が行われているが、海外の GenotypeⅠ型に対する LONESTAR Study の結果では SVR 率が 90%後半と高い治療効果が報告された。

### おわりに

本邦においてテラプレビルと比較して安全性の高いことが予想されるシメプレビルと IFN+RBV の併用療法が始まった。IFN-free の DAA のみの治療に近い将来使用可能となることが想定され、IFN 治療困難例を含め大幅に治療対象が拡大し高齢者、肝硬変症例、肝移植例、自己免疫疾患合併例などの多くが治療対象となることが期待される。現在の肝機能、前治療の反応性、発癌リスク、年齢また耐性ウイルスなどを考慮して症例ごとに適切な時期に、適切な治療を選択することが求められる。

表 1-2-1 本邦における HCV 経口薬併用臨床試験実施状況 (Ph.2 以上)

薬 剤	試験段階	製薬会社
NS5A 阻害薬+プロテアーゼ阻害薬 Daclatasvir + Asunaprevir ABT-450 + ABT-267	Ph.3 Ph.2	Bristol-Myers Squibb AbbVie
NS5A 阻害薬+ポリメラーゼ阻害薬 Ledipasvir + Sofosbuvir	Ph.3	Gilead
ポリメラーゼ阻害薬+RBV Sofosbuvir + RBV	Ph.3	Gilead
プロテアーゼ阻害薬+ポリメラーゼ阻害薬 Faldaprevir + Deleobuvir	Ph.3	Boehringer



文 献

- 1) Lohmann V, Körner F, Koch JO, Bartenschlager R, et al : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999 ; 285 : 110-113
- 2) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al : Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005 ; 11 : 791-796
- 3) 田辺三菱製薬社内資料. 使用成績調査 中間集計 Vol.5
- 4) 林 紀夫, 後藤章一郎 : ゲノタイプ1型C型肝炎に対するシメプレビル (TMC435) 併用療法 (CONCERTO-1 試験) の有効性の検討. *肝臓* 2013 ; 54 : A24
- 5) 泉 並木, 林 紀夫, 後藤章一郎 : ゲノタイプ1型C型肝炎におけるシメプレビル (TMC435) による再治療の有効性の検討 (CONCERTO-2/3 試験). *肝臓* 2013 ; 54 : A156
- 6) Gao M, Nettles RE, Belema M, et al : Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010 ; 465 : 96-100
- 7) McCown MF, Rajyaguru S, Le Pogam S, et al : The hepatitis C virus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to nonnucleoside polymerase or protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 ; 52 : 1604-1612
- 8) Karino Y, Toyota J, Ikeda K, et al : Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol* 2013 ; 58 : 646-654

＜C型肝炎治療の最前線＞

## IFN 少量長期療法の実際と新薬時代における役割

須田剛生 坂本直哉

特集 ウイルス肝炎診療の最前線と今後の展開 —— 日常臨床のポイントと知っておきたい最新情報

臨床雑誌「内科」第113巻 第4号〔2014年4月号〕別刷

南 江 堂

## ■ C型肝炎治療の最前線

# IFN 少量長期療法の実際と新薬時代における役割

須田剛生 坂本直哉

### Summary

- interferon (IFN) 治療においてウイルス排除ができなかった症例においても、ALT 値が正常化した症例では累積発がん率が低下した。
- 治療不応例や、治療耐用性の低い肝病態の進展した症例において、肝発がん予防を目的とした IFN 少量長期療法は有効な可能性がある。
- 欧米の成績では、IFN/ribavirin (RBV) 療法不応例の肝硬変患者への少量 IFN 投与で、長期における肝発がんを抑制する可能性が示された。
- 本邦の IFN 少量長期療法の成績では、治療後 24 週における ALT 値と AFP 値の正常化が肝発がん抑制と関連することが明らかとなった。

C 型慢性肝炎に対する治療は、IFN 単独療法に始まり、RBV の導入、peginterferon (Peg-IFN) 製剤の長期投与法の確立により、ウイルス排除率は 50% にまで向上した。さらに、つい最近 C 型肝炎ウイルス (HCV) のプロテアーゼをターゲットとした telaprevir が臨床にて使用可能となり、genotype 1 型の高ウイルス量症例においても著効率が 70~80% と上昇した。

しかし、一方で副作用による治療継続困難例も存在する。日本の C 型慢性肝炎患者は高齢化が進み、肝線維化進展例に対しては副作用や治療耐受性の問題がある。このような症例に対し、肝発がん抑制、肝不全への進展をいかに抑制するかは重要な問題であり、IFN 少量長期療法は現在にあってても有効な治療手段となる。

本邦においてもごく近い将来、IFN を使用しない経口薬の direct anti-viral agents (DAAs) のみの治療が使用可能となることが想定される。臨床試験においては高い持続的ウイルス陰性化

率 (sustained virologic response : SVR) と低い副作用発現率が報告されている。このような HCV 治療が、激変しつつある現在における IFN 少量長期療法の役割について述べさせていただく。

### IFN の発がん抑制効果

IFN 治療による最終治療目標は、SVR を達成し、肝線維化の改善と肝発がん抑制により肝関連死を減少させることである。しかしながら、治療抵抗性例や治療への容認性の問題から十分に治療が行えない症例も存在する。そのような SVR を得られなかった症例においても、治療後 ALT が正常化する生化学的著効が得られた症例においては、肝発がんが抑制されうとする報告が複数なされ、IFN 治療により SVR が得られなくても肝発がん抑制効果が期待できる可能性が示されている。

キーワード：IFN 少量長期療法、発がん抑制、AFP

すだたけお、さかもとなおや：北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野

本邦においてC型慢性肝炎患者1,643名に対する、IFN治療による肝発がん抑制効果についての後ろ向き検討では、10年累積発がん率は無治療群が12%、non-SVRかつ治療後も肝機能異常の持続した群が15%であったのに対し、SVR群では1.5%と有意に低下を認めた。さらに重要なことは、non-SVRでもALTが正常化した群における累積発がん率は2%と有意な低下を認めたことである<sup>1)</sup>。また本邦における多施設共同のコホート研究であるIHIT studyでは、登録症例2,890例の大規模研究により、IFN投与により肝発がんが抑制されること、さらにALTが正常の2倍以下に改善することでも、肝発がんを有意に抑制することを多変量解析にて明らかとした<sup>2)</sup>。

またつい最近、AsahinaらはIFN治療でnon-SVRとなった症例においても、治療によりALTが40 IU/L未満、AFPが6.0 ng/mL未満に低下した症例においては、累積発がん率が低下することを報告した<sup>3)</sup>。さらに、Araseらは治療耐用性が低いことが予想される高齢(60歳以上)の肝硬変患者に対して、IFNの長期投与を平均2.47年施行し、非IFN投与群と比較した。10年累積発がん率はIFN治療群で有意に低下し、またIFN治療群では有意にAFPが低下し、AFPが10 ng/mL未満の症例では発がん率が減少することが明らかとなった<sup>4)</sup>。以上の本邦からの多くの報告によりIFNの肝がん抑制効果が想定され、さらにRBVの併用などが困難な高齢者、肝硬変症例においてもIFNを少量長期に使い肝炎の鎮静化をめざすことで、肝発がんを抑制できるという可能性が示された。

## 海外におけるPeg-IFN少量長期療法の成績：HALT-C試験

欧米において、Peg-IFNとRBVによる治療が無効であった症例のうち、線維化の進展した、

または肝硬変患者1,050人に対して、Peg-IFN $\alpha$ 少量維持療法(Peg-IFN $\alpha$ -2a 3.5年間)の発がんを含む肝疾患関連イベントの抑制効果を、前向きに無作為比較検討したHALT-C試験が行われた<sup>5)</sup>。当初の報告では、IFN少量維持療法を行った群、行わなかった群、両群の間に肝病態の進展、さらに肝発がん率においても有意差を認めないと報告された。この結果を受けて、メンテナンスとして行うIFN少量長期投与に否定的な意見が欧米では優勢となった。しかしながら、HALT-C試験の観察期間を最大8.7年まで延長した成績の報告では、肝硬変患者においては、累積7年の肝発がん率はPeg-IFN $\alpha$ 治療群で7.8%であったのに対して、無治療群では24.2%であることが報告された。肝硬変患者に対するIFN少量長期投与により肝病態の進展した患者においては長期的には肝発がんを抑制することが示された。

## 日本におけるPeg-IFN少量長期療法の成績

本邦においても、Peg-IFN $\alpha$ -2a単独療法の発がん抑制効果について多施設共同研究の検討が行われた<sup>6)</sup>。Peg-IFN $\alpha$ -2a単独投与された594名が解析された。49例に発がんを認め、そのリスク因子としてIFN投与開始半年後のALT値が40 IU/L以上、AFP値が10 ng/mL以上であることが明らかとなった。HCV-RNAが陰性化しなかった症例に限定しても、投与24週目のALT 40 IU/L未満、AFP 10 ng/mL未満のいずれかが達成できた症例において、発がんが抑制されることが明らかとなった(図1)。年齢、性別、線維化の程度などをマッチさせた非IFN投与群59例とIFN投与群59例を比較したpropensity matched control studyも行われ、IFN投与群における累積発がん率が有意に低下することが明らかとなった。

この結果や、本邦からのIFN少量維持療法

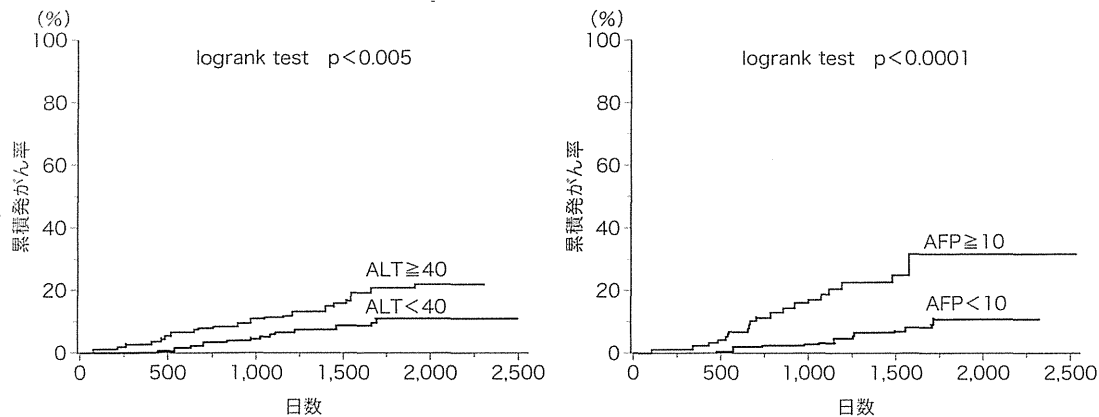


図1 Peg-IFN 少量長期療法 24 週目の ALT 値/AFP 値と発がん率

[文献6)より引用, 改変]

を施行した症例においての成績で、ALT または AFP が低下した症例で累積発がん率が低率であったことから、少量 IFN 治療の治療目標は ALT または AFP の低下を達成し肝発がんを抑制することと考えられる。

また、HALT-C 試験の結果と本邦との結果に一部解離があるが、HALT-C 研究の患者の発がん率が低いこと、対象患者の平均年齢が 52 歳とわが国における C 型慢性肝炎患者の平均年齢より若いことが、その原因の一つであることが推定されている。

## おわりに：DAA 時代における IFN 少量長期療法

2013 年 12 月、第二世代のプロテアーゼ阻害薬である simeprevir が世界に先駆けて、いよいよ本邦において使用可能となった。telaprevir 使用時の 3 剤併用療法に比べて副作用も軽減し、より安全に治療が行えることが期待されている。しかしながら、本邦における Phase III 試験において前治療不応例における SVR 率は 36~54% と依然厳しい成績であった。高発がん率と関連する高齢化が進む本邦において、治療不応例・肝予備能低下症例に対して、より効果・安全性の高い DAA の使用が可能とな

るまで肝線維化、肝発がんをいかに抑制するかを考慮するときに、IFN 少量長期療法は重要な治療オプションとなりえる。今後、数年以内に難治性例である genotype 1 型に対しての核酸型のポリメラーゼ阻害薬と NS5A 阻害薬を含む、強力な IFN-free の経口薬の治療が臨床で使用されることが予想されている。

しかしながら、耐性ウイルスの問題が存在し、さらに肝硬変/門脈圧亢進症例においては、なお十分な治療成績が期待できるかは明らかでない。IFN の少量長期投与療法は、DAA 療法への bridging therapy として、また DAA 不応となる症例における重要なオプションとなる。

また今後、DAA のみによる治療症例と IFN を含む治療症例における治療成功例・不成功例での AFP や ALT 値の改善の程度、ひいては肝発がん率に違いが生じるかは重要な検討課題となると考えられる。

## 文 献

- 1) Ikeda K et al : Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C. *Hepatology* 29 : 1124-1130, 1999
- 2) Yoshida H et al : Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma : national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann Intern Med* 131 : 174-181, 1999

- 3) Asahina Y et al :  $\alpha$ -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. Hepatology 58 (4) : 1253-1262, 2013
- 4) Arase Y et al : Prolonged-interferon therapy reduces hepatocarcinogenesis in aged-patients with chronic hepatitis C. J Med Virol 79 : 1095-1102, 2007
- 5) Di Bisceglie AM et al : Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose peginterferon. N Engl J Med 359 : 2429-2441, 2008
- 6) Izumi N et al : Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFNalpha-2a in patients with chronic hepatitis C : a nationwide multicenter cooperative study. J Gastroenterol 48 : 382-390, 2013

臨床医学一般 臨床医必読 検査値に関する最新情報をまとめた



臨床雑誌『内科』2013年6月増大号

## 検査値を読む2013

各検査値について、「基準値」「測定法」「何を知るための検査か」「異常値を示す場合」「異常値を示すメカニズム」「検査のピットフォール」「どう検査を進めるか」「異常値とその対策」で構成。内科医に必要な検査の知識をまとめた最新版。

■ B5判・610頁 2013.6. 定価（本体 8,400円＋税）

南江堂  
新刊・好評中

詳細情報（序文・目次・サンプルページ・書評）を弊社Web（[www.nankodo.co.jp](http://www.nankodo.co.jp)）でご案内しております。ぜひご覧ください。

主要目次	1章 尿検査	12章 骨代謝関連検査	23章 感染症検査
	2章 便検査	13章 肝・胆道機能検査	24章 下垂体および下垂体機能検査
	3章 血球検査	14章 腎機能検査	25章 甲状腺機能検査
	4章 造血器腫瘍関連検査	15章 酵素検査	26章 副腎皮質検査
	5章 遺伝子・染色体検査	16章 血清蛋白、その他の生化学検査	27章 副腎髄質検査
	6章 血栓・止血検査	17章 膵・消化管機能検査	28章 性腺・胎盤検査
	7章 輸血・血液型検査	18章 動脈血ガス分析と酸塩基平衡	29章 膵・消化管ホルモン検査
	8章 HLA 検査	19章 炎症マーカー検査	30章 各種生理活性物質検査
	9章 糖代謝検査	20章 アレルギー検査	31章 腫瘍マーカー検査
	10章 脂質代謝検査	21章 自己免疫検査	32章 薬剤代謝酵素遺伝子検査
	11章 電解質、ビタミン、無機質代謝検査	22章 細胞性免疫検査	33章 穿刺液検査

特集 ウイルス肝炎の薬物治療—変わりゆく治療戦略

ここまで変わったウイルス肝炎の治療

【C型慢性肝炎】

C型慢性肝炎に対する DAA<sub>s</sub> 併用インターフェロン治療  
(テラプレビル, シメプレビル, バニプレビル)

須田 剛生 坂本 直哉

medicina

第52巻 第2号 別刷

2015年2月10日 発行

医学書院

## 【C型慢性肝炎】

# C型慢性肝炎に対する DAAs 併用インターフェロン治療(テラプレビル, シメプレビル, バニプレビル)

須田 剛生・坂本 直哉

ポイント

- 新規抗ウイルス薬 DAAs(テラプレビル, シメプレビル, バニプレビル)併用インターフェロン(IFN)療法により, 難治例である genotype 1 型・高ウイルス量症例においても高い治療効果が期待できる.
- テラプレビル併用療法においては, 特に皮疹・腎障害・貧血などの合併症に注意が必要である. シメプレビル併用療法は, Peg-IFN/リバビリンと同等の安全性が報告されている.
- 治療不成功例においては, DAAs 耐性ウイルスが高率に発生する.
- IFN 前治療無効例の治療成績は 30~60%程度である.

本邦においてC型慢性肝炎患者は150万人以上存在し, 発癌ポテンシャルの高くなる患者の高齢化の問題も抱えている. したがって, C型慢性肝炎は今なお本邦における慢性肝疾患・肝臓の主因であり, これに対する抗ウイルス療法は, 肝関連死を減少させるためには必須である. C型肝炎に対する治療は, 1992年よりインターフェロン(interferon: IFN)単独療法が開始され, 続いてリバビリン(ribavirin: RBV)が導入され, IFNとの併用療法が行われた. さらに2004年にPeg化インターフェロン(Peg-IFN)製剤の長期投与が可能となり, 1型の高ウイルス症例におけるウイルス学的著効(sustained virological response: SVR)率は50%にまで向上した.

しかしながら, 治療成績は十分とは言えず, IFN以外の治療薬の登場が期待された. 1999年にBartenschlagerらにより, *in vitro*でのHCV培養系が開発されたことを契機に, ウイルス蛋白を直接標的にしたDAAs(direct acting antivirals)薬剤が開発され, 近年, 急速に臨床試験も多数行われ

るようになった. 最初に開発が進んだのが, HCVプロテアーゼ阻害薬である. HCV非構造蛋白であるNS3/4A蛋白はプロテアーゼとして働き, 翻訳されたHCV非構造蛋白の境界を切断する. したがって, HCVプロテアーゼの活性を阻害することによりウイルス増殖を抑制することが可能となる. HCVプロテアーゼ阻害薬はその構造とそれに伴う耐性変異のパターンから, 大きく2群に分けられる. 1つは, 第1世代プロテアーゼ阻害薬に分類される, 分岐のない直鎖状の分子構造を取るテラプレビルに代表されるグループである. もう一群は, 分子内に環状構造(macrocylic)または分岐構造をもつシメプレビル, バニプレビルに代表される第2世代プロテアーゼ阻害薬である.

本邦においても, 2011年よりテラプレビルとPeg-IFN/RBVの3剤併用療法(以下, テラプレビル3剤併用療法)が開始され高い治療成績を収めたが, 重篤な副作用などの問題も認められた. そして2013年12月より世界に先駆けて, 本邦においてシメプレビルが承認され, Peg-IFN/RBVとの3剤併用療法

すだ ごうき・さかもと なおや:北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 ☎060-8638 札幌市北区北15条西7

0025-7699/15/Y800/論文/JCOPY

medicina Vol.52 No.2 2015-2 305



(以下、シメプレビル3剤併用療法)が開始された。さらに2014年9月にはバニプレビルが承認され、同年11月よりPeg-IFN/RBVとの3剤併用療法(以下、バニプレビル3剤併用療法)が開始されている。

本稿では、C型肝炎に対するテラプレビル、シメプレビル、バニプレビル併用Peg-IFN/RBV療法について概説する。

## テラプレビル 3剤併用療法

本邦において2011年より難治性である genotype 1型・高ウイルス量症例に対して、テラプレビル3剤併用療法が臨床において使用可能となった。本邦における第Ⅲ相試験ではIFN初回投与例に対するSVR率は73%と、コントロール群であるPeg-IFN/RBV 48週投与群より有意に高い治療効果を認めた<sup>1)</sup>。また、前治療再燃例においても88%と高いSVR率を認めたが、一方で、前治療無効例においては34%と十分な成績ではなかった。

副作用に関しては、既治療では認めなかった重篤な副作用が認められた。テラプレビル3剤併用療法による重要な副作用は、皮膚障害、貧血、血中クレアチニン増加(腎障害)、高尿酸血症である。特に皮膚症状は特徴的な副作用で、85%の患者に発現し、重症度はPeg-IFN/RBV併用療法よりも高く、Stevens-Johnson症候群(SJS)や薬剤性過敏症症候群(drug induced hypersensitivity syndrome: DIHS)、および粘膜症状を伴う多型紅斑など、重篤な皮疹が1.5%(4例/267例)に出現した。そのため、テラプレビル3剤併用療法を行う際には皮膚科専門医との連携の下、厳重な注意が必要であり、いかにその重症化を予測するかが重要と考えられた。

そこで当科および関連施設によるNORTE STUDY GROUPにおいて、テラプレビル3剤併

用療法を行った症例における皮疹の発現についてバイオマーカーの検討を行い、グラニューライシンに着目した。グラニューライシンは、ナチュラルキラー(natural killer: NK)細胞や細胞障害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte: CTL)から恒常的に放出される分子量15 kDaの蛋白質で、SJSの病態形成に深く関与することが報告されていた。われわれの検討では、血清グラニューライシン値はテラプレビルによる皮疹の重症度と相関して有意に上昇し、全身症状を伴うgrade 3の皮疹症例においては、重症化する前に、すでに血清グラニューライシン値が上昇していることが確認でき、予測因子となりうる可能性が考えられた<sup>2)</sup>。

また、市販後の調査にて、65歳以上の高齢者においてはテラプレビルの投与量を減量することにより副作用を軽減できる可能性が示唆されており、高齢者においては減量を考慮するべきである。

DAAs特有の問題点として、薬剤耐性ウイルスの出現が挙げられる。テラプレビル耐性変異(V36, T54, R155, A156, V170)をもつウイルスは、治療不成功例の80~90%程度に出現することが報告されている。この新たに出現したテラプレビル耐性ウイルスは経時的に減少することが報告されているが、次治療の際の影響については今後の研究課題である。

## シメプレビル 3剤併用療法

テラプレビルに続いて、2013年12月より世界に先駆けてシメプレビルが本邦で承認されPEG-IFN/RBVとの3剤併用療法が開始された。シメプレビルは血中薬物動態が向上しており、1日1回の経口投与で効果が発現し、薬剤相互作用はテラプレビルと比較して併用禁忌薬が減少し、使い勝手が良くなっている。

本邦におけるIFN初回治療例に対するシメプレ

ビル併用療法の CONCERTO-1 試験<sup>3)</sup>では、SVR 率が 89%と高い奏効率を認め、対照群の Peg-IFN/RBV48 週投与群より有意に高かった。また、IFN 前治療再燃例において本邦で検討された CONCERTO-3 試験においても、SVR24 は 90% (44 例/49 例)と高い奏効率も認める一方で、IFN 前治療無効例において行われた CONCERTO-2 試験では SVR 率が 36~51%であった。

副作用に関しても、国内第Ⅲ相試験において、対照の PEG-IFN/RBV 併用療法と同程度であり、高い安全性が確認された。シメプレビルに特徴的な副作用は、肝のトランスポーター阻害によると思われる、ALT 上昇を伴わない一過性のビリルビン上昇であり、40.7%の症例において認められた。

シメプレビルに対する薬剤耐性ウイルスは、テラプレビルとの構造の違いのため、36 番、54 番、170 番のアミノ酸変異に対しては感受性があり、しかし 155 番、156 番のアミノ酸変異に対しては交叉耐性を示す。さらに、80 番、168 番のアミノ酸変異はシメプレビルに対してのみ耐性がある。テラプレビルと同様に、治療不成功例においては 90%以上で耐性ウイルスが出現しており、そのほとんどが 168 番の変異を有していた。

## バニプレビル 3 剤併用療法

シメプレビルに続く第 2 世代プロテアーゼ阻害薬として、バニプレビルが 2014 年 11 月に発売された。国内第Ⅲ相試験では、初回治療例 196 人に対して、バニプレビル 12 週投与と Peg-IFN/RBV 24 週投与 (98 例)が、Peg-IFN/RBV 48 週投与 (98 例)を対照群として行われた。バニプレビル群の

SVR24 は 83.7% (82 例/98 例)と、コントロール群の 55.1% (54 例/98 例)と比較して有意に高い結果となった。

IFN 前治療再燃例においての検討では、IFN 未治療例と同様のプロトコールにより検討が行われ、SVR24 が 92% (23 例/25 例)と良好な結果であった。また、前治療無効例においてはバニプレビル 3 剤併用療法 24 週が 42 例に対して行われた。SVR24 は、全体で 61.9% (26 例/42 例)、前治療 partial responder では、76.9% (10 例/13 例)、前治療 null responder においては 55.2% (16 例/19 例)であった。

## おわりに

DAA 併用インターフェロン療法を行うことにより、難治性例の genotype1 型症例においても、高い SVR 率を達成することができるようになった。しかしながら、耐性ウイルスや前治療無効例などの問題点も存在する。現在は、IFN フリーの DAA 2 剤による治療も施行可能となっている。症例ごとに、耐性ウイルスなども考慮して最適の治療を選択することが求められる。

### 文献

- 1) Kumada H, et al: Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naïve patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol* 56: 78-84, 2012
- 2) Suda G, et al: Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res*, 2014 (in press)
- 3) Hayashi N, et al: simeprevir with peginterferon/ribavirin for treatment-naïve hepatitis C genotype 1 patients in Japan: CONCERTO-1, a phase III trial. *J Hepatol* 61: 219-227, 2014

# Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma

Seiji Tsunematsu,<sup>1</sup> Makoto Chuma,<sup>1,5</sup> Toshiya Kamiyama,<sup>2</sup> Noriyuki Miyamoto,<sup>3</sup> Satoshi Yabusaki,<sup>3</sup> Kanako Hatanaka,<sup>4</sup> Tomoko Mitsuhashi,<sup>4</sup> Hirofumi Kamachi,<sup>2</sup> Hideki Yokoo,<sup>2</sup> Tatsuhiko Kakisaka,<sup>2</sup> Yousuke Tsuruga,<sup>2</sup> Tatsuya Orimo,<sup>2</sup> Kenji Wakayama,<sup>2</sup> Jun Ito,<sup>1</sup> Fumiyuki Sato,<sup>1</sup> Katsumi Terashita,<sup>1</sup> Masato Nakai,<sup>1</sup> Yoko Tsukuda,<sup>1</sup> Takuya Sho,<sup>1</sup> Goki Suda,<sup>1</sup> Kenichi Morikawa,<sup>1</sup> Mitsuteru Natsuizaka,<sup>1</sup> Mitsuru Nakanishi,<sup>1</sup> Koji Ogawa,<sup>1</sup> Akinobu Taketomi,<sup>2</sup> Yoshihiro Matsuno,<sup>4</sup> Naoya Sakamoto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, 15 Kita, 7 Nishi, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan

<sup>2</sup>Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

<sup>3</sup>Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

<sup>4</sup>Department of Surgical Pathology, Hokkaido University Hospital, Sapporo, Japan

<sup>5</sup>Gastroenterological Center, Yokohama City University Medical Center, Yokohama, Kanagawa, Japan

## Abstract

**Aim:** Differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) from poorly differentiated hepatocellular carcinoma (p-HCC) is often difficult, but it is important for providing appropriate treatments. The purpose of this study was to examine the features differentiating ICC from p-HCC on contrast-enhanced dynamic-computed tomography (CT).

**Methods:** This study examined 42 patients with pathologically confirmed ICC ( $n = 19$ ) or p-HCC ( $n = 23$ ) for which contrast-enhanced dynamic CT data were available. CT images were analyzed for enhancement patterns during the arterial phase, washout pattern, delayed enhancement, satellite nodules, capsular retraction, lesion shape, and presence of an intratumoral hepatic artery, intratumoral hepatic vein, intratumoral portal vein, and bile duct dilation around the tumor, portal vein tumor thrombus, lobar atrophy, or lymphadenopathy.

**Results:** Univariate analysis revealed the presence of rim enhancement ( $p = 0.037$ ), lobulated shape ( $p = 0.004$ ), intratumoral artery ( $p < 0.001$ ), and bile duct dilation ( $p = 0.006$ ) as parameters significantly favoring ICC, while a washout pattern significantly favored p-HCC ( $p < 0.001$ ). Multivariate analysis revealed intratumoral artery as a significant, independent variable predictive of ICC ( $p = 0.037$ ), and 15 ICCs (78.9%) showed this feature. Washout pattern was a significant, independent variable favoring p-HCC ( $p = 0.049$ ), with 15 p-HCCs (65.2%) showing this feature.

**Conclusion:** The presence of an intratumoral artery in the arterial phase on contrast-enhanced dynamic CT was a predictable finding for ICC, and the presence of a washout pattern was a predictable finding for p-HCC, differentiating between ICC and p-HCC.

**Key words:** Intrahepatic cholangiocarcinoma—Intratumoral artery—Poorly differentiated hepatocellular carcinoma—Contrast-enhanced CT—Differential diagnosis

Correspondence to: Makoto Chuma; email: chuma@yokohama-cu.ac.jp

Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is the second most common primary liver malignancy after hepatocellular carcinoma (HCC) and originates from the epithelial lining of the intrahepatic bile duct [1]. Several studies have shown that the incidences of ICC and HCC have been increasing [2–4]. Contrast-enhanced dynamic-computed tomography (CT) has a primary role to play in the differential diagnosis of focal liver lesions, including HCC and ICC. Bile duct dilatation and rim-like contrast enhancement are frequently seen on contrast-enhanced CT of ICC [5]. Classic advanced HCC appears as a round tumor showing intense hyperenhancement in the arterial phase, followed by washout during dynamic imaging [6]. Knowledge of the typical imaging features of ICC and HCC would facilitate accurate diagnosis in most cases.

However, advanced HCCs such as poorly differentiated HCC (p-HCC) might not be as hypervascular as classic HCC, which might cause difficulty in differentiation from ICC. Differentiating ICC from p-HCC can reduce the risk of inappropriate treatments for ICC, such as transarterial chemoembolization aimed at HCC. ICC is usually fatal because of the lack of effective non-surgical therapeutic modalities, so correct diagnosis of ICC based on radiological findings may have prognostic significance, particularly in determining treatment methods [7]. Furthermore, definitive diagnosis of ICC will help oncologists to consider adequate treatments, such as complete resection including lymph node dissection.

Although some reports have described the radiological characteristics of ICC and HCC [5, 6, 8, 9], no reports appear to have described imaging findings for pathologically confirmed ICC and p-HCC. On contrast-enhanced CT, intratumoral arteries were often seen in ICC. However, there have been no previous reports that intratumoral arteries on CT distinguish ICC from HCC.

The purpose of this study was to assess the CT features and enhancement patterns differentiating ICC from p-HCC; furthermore, we evaluated whether the presence of an intratumoral artery could be an independent predictor for differentiating ICC from p-HCC.

## Methods

### *Patients*

This study was approved by the ethics committees of Hokkaido University Hospital. All study protocols were approved by the institutional review board and performed in compliance with the Declaration of Helsinki.

We retrospectively searched the surgical treatment database at our hospital from July 2003 to December 2012, using the search terms “poorly differentiated HCC” and “ICC.” Forty-two patients with histopathological confirmation of either ICC ( $n = 19$ ) or p-HCC ( $n = 23$ ) who had undergone contrast-enhanced CT in our institution were included in this study. The

final diagnosis of all tumors was confirmed by histopathological examination of surgical specimens. Histological diagnosis was made according to World Health Organization criteria [10, 11]. Combined-type liver cancers were excluded to more clearly investigate differential points of CT imaging between poorly differentiated HCC and ICC. Patient demographics and tumor characteristics are summarized in Table 1.

The 19 patients with ICC included 13 men and 6 women (age range 48–79 years), while the 23 patients with p-HCC included 19 men and 4 women (age range 37–79 years). Serum levels of hepatitis B surface antigen and hepatitis C antibody, alpha-fetoprotein (AFP), protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II), carcinoembryonic antigen (CEA), and carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) were examined preoperatively in all patients.

### *Image analysis*

CT images were obtained by using Aquilion 64 ( $n = 16$ , Toshiba Medical Systems, Tochigi, Japan), Aquilion 4-slice CT ( $n = 12$ , Toshiba Medical Systems, Tochigi, Japan), light Speed VCT ( $n = 6$ , GE, Waukesha, WI, USA), Somatom Volume Zoom ( $n = 4$ , Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany), and Somatom Sensation 64 ( $n = 4$ , Siemens AG Medical Solutions, Erlangen, Germany).

Unenhanced and 3-phase contrast-enhanced helical CT images were obtained. An automatic bolus-tracking program (Real Prep; Toshiba Medical Systems) was used to time the start of scanning for each phase after contrast material injection. Monitoring was performed at the level of the L1 vertebral body, with the region of interest cursor ( $0.8\text{--}2.0\text{ cm}^2$ ) placed in the abdominal aorta. Real-time serial monitoring studies began 10 s after the start of contrast injection. The trigger threshold level was set at 200 Hounsfield units. Arterial phase and portal venous phase scanning started at 20 and 40 s after triggering, respectively. Delayed phase scanning started 180 s after the contrast injection. Contrast material (mean, 450 mg of iodine per kilogram body weight) was delivered over a period of 30 s.

Two radiologists (N.M. and S.Y. with 18 and 8 years of post-training experience in interpreting body CT images, respectively) who had no knowledge of clinical patient information performed all measurements by using a commercially available Digital Imaging and Communications in Medical viewer (VOX BASE; J-MAC, Sapporo, Japan).

The following CT features were evaluated: (1) lesion size; (2) satellite nodules (Fig. 1A); (3) capsular retraction (Fig. 1B); (4) lobulated shape of lesion (Fig. 1C); (5) rim enhancement during arterial phases (Fig. 1C); (6) intrahepatic bile duct dilation around the tumor