

201449012A

厚生労働科学研究委託費

肝炎等克服実用化研究事業
(肝炎等克服緊急対策研究事業)

C型肝炎の抗ウイルス治療法選択を目的とした
新規検査系に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 鈴木 文孝

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）による委託業務として国家公務員共済組合連合会 虎の門病院が実施した平成 26 年度「C 型肝炎の抗ウイルス治療法選択を目的とした新規検査系に関する研究」の成果をとりまとめたものです。

C型肝炎の抗ウイルス治療法選択を目的とした
新規検査系に関する研究

業務担当者名簿

業務主任者	鈴木文孝	国家公務員共済組合連合会虎の門病院肝臓センター	部長
業務担当者	狩野吉康	北海道厚生連札幌厚生病院	副院長
業務担当者	前川伸哉	山梨大学医学部第一内科	講師
業務担当者	宇都浩文	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・消化器疾患・生活習慣病学	准教授
業務担当者	瀬崎ひとみ	国家公務員共済組合連合会虎の門病院肝臓センター	医員
業務担当者	小松通治	信州大学医学部内科学第二教室	特助教
業務担当者	荒井邦明	金沢大学附属病院消化器内科	助教
業務担当者	平賀伸彦	広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門消化器・代謝内科学	特助教

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

- C型肝炎の抗ウイルス治療法選択を目的とした新規検査系に関する研究……………1
鈴木 文孝

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. DCV/ASV 経口 2 剤治療における耐性変異測定法とその臨床的意義に関する研究……………9
小松 通治
2. HCV 感染末期腎不全患者における DCV/ASV 耐性変異の検討に関する研究……………11
宇都 浩文
3. 次世代シーケンス技術を用いた DAA 耐性変異 HCV の検出に関する研究……………13
前川 伸哉
4. アスナプレビル・ダクラタスビル療法施行例におけるウイルス遺伝子変異に関する検討の解析に関する研究……………16
荒井 邦明
5. DCV/ASV 療法の薬剤耐性と背景因子からみた HCV Dynamics に関する研究……………20
狩野 吉康
6. C型肝炎の抗ウイルス治療法選択を目的とした新規検査系に関する研究……………23
平賀 伸彦
7. DCV/ASV 療法における薬剤耐性と治療効果に関する研究……………25
瀬崎ひとみ

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………31

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………39

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業研究事業）

委託業務成果報告（総括）

C型肝炎の抗ウイルス治療法選択を目的とした新規検査系に関する研究に関する研究

業務主任者 鈴木文孝 国家公務員共済組合連合会虎の門病院肝臓センター 部長

研究要旨;C型慢性肝疾患の治療は近年ウイルス蛋白を直接阻害する Direct acting antivirals (DAAs) による治療が開始され、インターフェロン(IFN)に抵抗性の症例や合併症にて IFN 療法が困難な症例に IFN フリーの治療であるプロテアーゼ阻害剤と NS5A 阻害剤の内服治療が開始されている。この際 NS3, NS5A 領域の治療前における遺伝子変異(耐性ウイルス)の存在は DAAs の治療効果を予測する因子となることが報告されている。本研究は、HCV 感染例を対象とし、新規薬剤である DAAs 等の治療を行う際の治療効果に関する HCV 遺伝子変異の新規測定系の確立と臨床応用を目的とする。

Invader 法 NS5A aaY93H (NS5A-Y93H) 相対定量系は、NS5A 領域の aa88-99 番目を増幅するように設計した primer を用いて PCR と invader 反応を同時に行い PCR サイクルごとに蛍光強度を測定しそれぞれのコピー数を算出後変異型の相対比率を求め測定系を確立した。また、Invader 法定性系の測定系を NS3-D168E, NS5A-L31M, -Y93H で作成した。

DCV+ASV 併用療法施行例 130 例における治療効果と Invader 法 NS5A-Y93H (相対定量系) のデータを解析した。全症例での SVR 率は 84%(109/130)であった。Invader 法による NS5A-Y93H (相対定量系) の治療前測定では、Y93H の検出率は 27%(35/130)であった。Y93H 混在比率(<1%)の症例(95 例)で高率に SVR (97%;92/95) が得られていた。このうち混在比率(<1%)の症例で、NS3 aaD168E, NS5A aaL31M 変異を認めない症例(92 例)では 100%の SVR 率であった。また Y93H の混在比の上昇とともに SVR 率の低下を認めた。一方 PCR direct-sequence 法では、Y93H 変異は 129 例中 32 例(25%)で検出された。Y93(wild)の症例の SVR 率は 96%(93/97)であり、Y93H の症例では 47%(15/32)であった。PCR Direct-sequence 法と Invader 法相対定量測定での測定結果の一致率は 96%(125/130)であった。Direct-sequence 法で耐性ウイルスが検出されず non-SVR になった 1 例では aaY93H 相対定量系で耐性ウイルスが検出され、Invader 法の有用性が示された。

Invader 法定性系と治療成績との関係を検討した。Y93H 定性陽性例は 27 例であったが、このうち Y93H 相対定量系では 24 例(88%)で検出され、定性陽性例の SVR 率は 52%(14/27)であった。また Y93H 定性弱陽性例 20 例では Y93H 相対定量系では 6 例(30%)で検出され、定性弱陽性例の SVR 率は 80%(16/20)であった。L31M 定性陽性例は 4 例であったが、定性陽性例の SVR 率は 25%(1/4)であった。この 4 例は PCR direct-sequence 法でも陽性であった。また L31M 定性弱陽性例 3 例では SVR 率は 67%(2/3)であったが、PCR direct-sequence 法では陰性であった。D168E 定性陽性例は 3 例であったが、定性陽性例の SVR 率は 67%(2/3)であった。この 3 例中 1 例で PCR direct-sequence 法で陽性であった。また D168E 定性弱陽性例 40 例では、SVR 率は 88%(35/40)であった。しかし全例 PCR direct-sequence 法では陰性であった。定性系の弱陽性例は、治療効果との関係が少なかった。

Deep sequence 法と Direct sequence 法の比較検討では、Y93H 変異検出は deep sequence 法で 25% 以上耐性ウイルスが存在すると direct sequence 法でも検出された。また Invader 法 NS5A-Y93H 相対定量系と Deep sequence 法との比較検討では、 $y = 0.9184x + 5.366$ 、 $R^2 = 0.6982$ で相関を認めた。

一方 DCV+ASV 治療での Viral breakthrough 後の解析では、direct sequence 法、Invader 法いずれに NS3-D168E, NS5A-L31M, NS5A-Y93H が検出された。さらに治療終了後 108 週目の時点では、Invader 法 NS5A-Y93H 相対定量系で 99% から 42% と耐性ウイルスの減少が認められた。製造販売後の症例からの検討では、治療開始後 12 週目までの HCV RNA 陰性化率は、Invader 変異相対定量系で変異を検出された症例で陰性化が遅い傾向にあった。

来年度以降は、製造販売後の DCV+ASV 併用療法施行例における耐性ウイルス (NS3-aaD168E, NS5A-aaL31M, aaY93H) の有無と治療効果についての多数例での検討が必要である。また DCV+ASV 治療での non SVR 例における耐性ウイルスの長期的推移を新規測定系での検討も行う。またサイクリングプローブ法などの新規測定系の耐性ウイルス検出や DCV+ASV 治療における臨床効果との関係やペグインターフェロン、リバビリン、DAA (テラプレビル、シメプレビル) 治療における non SVR 例での耐性ウイルスの推移を新規測定系で検討する。さらに新たな内服治療 (ポリメラーゼ阻害剤を含む) における耐性ウイルスの検出と治療効果との関係についても検討する予定である。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

鈴木文孝	国家公務員共済組合連合会虎の門病院 肝臓センター 部長
狩野吉康	北海道厚生連札幌厚生病院 副院長
前川伸哉	山梨大学医学部第一内科 講師
宇都浩文	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・消化器疾患・生活習慣病学 准教授
瀬崎ひとみ	国家公務員共済組合連合会虎の門病院 肝臓センター 医員
小松通治	信州大学医学部内科学第二教室 特助教
荒井邦明	金沢大学附属病院消化器内科 助教
平賀伸彦	広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門消化器・代謝内科学 特助教

A. 研究目的

C 型慢性肝疾患の治療は近年ウイルス蛋白を直接阻害する Direct acting antivirals (DAAs) による治療が開始され、インターフェロン (IFN) に抵抗性の症例や合併症にて IFN 療法が困難な症例に IFN フリーの治療であるプロテアーゼ阻害剤と NS5A 阻害剤の内服治療が開始

されている。この際 NS3, NS5A 領域の治療前における遺伝子変異 (耐性ウイルス) の存在は DAAs の治療効果を予測する因子となることが報告されている。本研究は、HCV 感染例を対象とし、新規薬剤である DAAs 等の治療を行う際の治療効果に関係する HCV 遺伝子変異の新規測定系の確立と臨床応用を目的とする。

B. 研究方法

現在 C 型肝炎の治療としてプロテアーゼ阻害剤とペグインターフェロン + リバビリン併用療法が行なわれているが、インターフェロン不適格 / 不耐容例およびインターフェロン療法の無効例 (non response) にはプロテアーゼ阻害剤、NS5A 阻害剤やポリメラーゼ阻害剤を組み合わせた IFN フリーの治療が行われている。しかし、これらの薬剤は、NS3, NS5A 領域の治療前における遺伝子変異の存在が DAAs の治療効果を予測する因子となることが報告されている。今年度は、新規測定系である Invader 法 NS5A aaY93H (NS5A-Y93H) 相対定量系の測定の確立とともに変異測定結果と NS5A 阻害剤 (Daclatasvir; DCV)、プロテアーゼ阻害剤 (Asunaprevir; ASV) 併用療法の治療効果の検討を研究班 (上記施設) でおこなった。さらに各業務担当者の創意工夫に基づいて、それぞれの研究を施行した。

C. 研究結果

業務代表者 (鈴木文孝)

①新規測定系の確立

Invader 法 NS5A-Y93H 相対定量系は、NS5A 領域の aa88-99 番目を増幅するように設計した primer を用いて PCR と invader 反応を同時に行い PCR サイクルごとに蛍光強度を測定しそれぞれのコピー数を算出後変異型の相対比率を求め測定系を確立した。(図1)また、Invader 法定性系の測定系を NS3-aaD168E (NS3-D168E), NS5A-aaL31M (NS5A-L31M), NS5A-Y93H で作成した。

②Invader法の測定結果とNS5A阻害剤(DCV)、プロテアーゼ阻害剤(ASV)併用療法の治療成績との関係(全班員の共同研究)

DCV+ASV 併用療法施行例 130 例における治療効果と Invader 法 NS5A-Y93H 相対定量系のデータを解析した。全症例での SVR 率は 84%(109/130)であった。Invader 法による NS5A-Y93H 相対定量系にて治療前 Y93H の測定を施行した。Y93H の検出率は 27%(35/130)であった。Y93H 混在比率(<1%)の症例(95 例)では、高率に SVR (97%;92/95)が得られていた。このうち混在比率(<1%)の症例で、NS3-D168E, NS5A-L31M 変異を認めない症例(92 例)では 100%の SVR 率であった。一方 Y93H の混在比 1-20%の症例では、SVR 率は 75%(6/8)、21%以上では 41%(11/27)であり Y93H の混在比の増加とともに SVR 率の低下を認めた。(図2)一方 PCR direct-sequence 法では、Y93H 変異は 129 例中 32 例(25%)で検出された。Y93(wild)の症例の SVR 率は 96%(93/97)であり、Y93H の症例では 47%(15/32)であった。PCR Direct-sequence 法での NS5A-Y93H 変異の測定と Invader 法相対定量系との測定結果の一致率は 96%(125/130)であった。Direct-sequence 法で耐性ウイルスが検出されず non-SVR になった 1 例では aaY93H 相対定量系で耐性ウイルスが検出された(5%)。

次に Invader 法定性系と治療成績との関係を検討した。Y93H 定性陽性例は 27 例であったが、このうち Y93H 相対定量系では 24 例(88%)で検出され、定性陽性例の SVR 率は 52%(14/27)であった。また Y93H 定性弱陽性例 20 例では Y93H 相対定量系では 6 例(30%)で検出され、定性弱陽性例の SVR 率は 80%(16/20)であった。L31M 定性陽性例は 4 例であったが、定性陽性例の SVR 率は 25%(1/4)であった。この 4 例は PCR direct-sequence 法

でも陽性であった。また L31M 定性弱陽性例 3 例では、SVR 率は 67%(2/3)であった。この 3 例は PCR direct-sequence 法では陰性であった。D168E 定性陽性例は 3 例であったが、定性陽性例の SVR 率は 67%(2/3)であった。この 3 例中 1 例で PCR direct-sequence 法で陽性であった。また D168E 定性弱陽性例 40 例では、SVR 率は 88%(35/40)であった。しかし全例 PCR direct-sequence 法では陰性であった。

来年度以降は、製造販売後の DCV+ASV 併用療法施行例における耐性ウイルス(NS3-D168E, NS5A-L31M, aaY93H)の有無と治療効果についての多数例での検討が必要である。また DCV+ASV 治療での non SVR 例における耐性ウイルスの長期的推移を新規測定系での検討も行う。またサイクリングプローブ法などの新規測定系の耐性ウイルス検出や DCV+ASV 治療における臨床効果との関係やペグインターフェロン、リバビリン、DAA(テラプレビル、シメプレビル)治療における non SVR 例での耐性ウイルスの推移を新規測定系で検討する。さらに新たな内服治療(ポリメラーゼ阻害剤を含む)における耐性ウイルスの検出と治療効果との関係についても検討する予定である。

業務担当者(小松通治)

長野県内の経口 2 剤治療予定者を対象に、治療前に耐性変異を Invader 法定性系にて測定した。372 例で測定を行った。男性 171 例、女性 201 例、年齢 69 歳(25-84)、195 例で前治療歴を認めた。長野県における耐性ウイルスの検出頻度は、Y93H 59/372(15.8%)、L31M/F/V 16/372(4.3%)、D168A/E/H/T/V 3/372(0.8%) であり既報と同様の結果が得られた。

業務担当者(宇都浩文)

HCV 感染末期腎不全患者における C 型肝炎の臨床的研究と DCV/ASV 耐性変異について検討した。鹿児島県における透析症例(n=2588)での HCV 抗体陽性率は 9.4%であり、このうち HCV RNA 陽性率は 79%であった。ALT 値は、非透析患者より透析患者の方が低値であるが、HCV 感染透析患者の ALT 値は HCV 非感染透析患者より高く、血小板数は HCV 感染透析患者の肝線維化を反映した。さらに ALT が 15~20 以上は、HCV 感

染透析患者の肝線維化進展に寄与していた。

HCV感染末期腎不全患者のDCV+ASVに対するHCV薬剤耐性変異の頻度は、PCR direct-sequence法で11.1%(1/9)であり腎機能正常HCV感染者(7.5%;20/265)と差は認めなかった。さらにInvader法定性系の測定でDCV+ASVに対するHCV薬剤耐性変異は、透析の影響を受けないと考えられた。今後、HCV感染末期腎不全患者のDCV+ASVに対するHCV薬剤耐性変異、DCV+ASVの効果及び安全性を、多数例で検討する必要があると思われた。

業務担当者(前川伸哉)

多数のDAA(direct antiviral agent)が開発され、これらの組み合わせによる様々な治療・臨床試験が進みつつあるがDAAに対する多剤耐性変異出現が懸念されている。この研究では、高感度かつ簡便な耐性HCV検出系を確立し、その臨床的意義を明らかにすることを目的とした。DAA未投与症例(110例)におけるNS5A阻害剤耐性の解析(deep sequence法)を行った。NS5A-L31M/V/F変異は12%(13/110)、NS5A-Y93H/N変異は35%(34/110)で検出された。NS5A阻害剤耐性変異は多変量解析にて検討するとIL28B SNP major type (TT)症例に多く認められた。Direct sequence法での検討ではY93H変異検出はdeep sequence法で25%以上耐性ウイルスが存在するとdirect sequence法でも検出された。一方NS3領域のプロテアーゼ阻害剤に対する耐性ウイルスについてdeep sequence法で解析を行った。V36A/I/L 9.1%, T54A/S 7.3%, V55A/K 0.9%, Q80K/R 3.6%, R155Q 0.9%, A156T 2.7%, D168A/V/T/H/E 0%, V170A/T 1.8%で検出された。IL28BSNPと耐性ウイルス検出には関係は認められなかった。今後Digital PCR法、Invader法を用いたDAA耐性変異検出法を検討・評価し、最適な検出システムを確立し、臨床的意義を明らかにする予定である。

業務担当者(荒井邦明)

DCV/ASV治療を行った5例に関してInvader法とdirect sequence法で検討を行った。投与中viral breakthroughを認めた1例では、direct sequence法では開始時耐性ウイルスを認めていなかったが、Invader法NS5A-Y93H

相対定量系で14%検出されていた。Viral breakthrough後はdirect sequence法、Invader法いずれにNS3-D168E, NS5A-L31M, NS5A-Y93Hが検出された。さらに治療終了後108週目の時点では、Invader法NS5A-Y93H相対定量系で99%から42%と耐性ウイルスの減少が認められた。治療2週目で中止になった症例では、開始時耐性ウイルスはInvader法、direct sequence法いずれでも認めていなかったが、中止後10週目でInvader法NS5A-Y93H相対定量系で24%と耐性ウイルス検出され、NS5A-L31M/VもInvader法定性で検出された。Direct sequence法では、NS5A-L31V, Y93Y/Hであった。その後治療中止後109週目では、direct sequence法では耐性ウイルスは検出されなかったが、Invader法NS5A-Y93H相対定量系で11%検出、NS5A-L31VもInvader法定性で検出された。一方残り3例はSVRになったが、このうち2例は開始時Invader法、direct sequence法いずれも耐性ウイルスを認めなかった。残り1例は開始時direct sequenceのみでNS5A-L31M変異を認めていたがSVRとなった。NS5A-Y93H変異に関して、invader法は、direct sequence法ではdetection困難な10~20%のpopulationを検出可能で、治療効果予測に有用と考えられた。一方コンプライアンスの低下による治療不成功は、治療終了後も耐性ウイルスを誘発する可能性がある。さらに治療開始前のNS3耐性変異ウイルスの存在は、相当量のNS5A-Y93H変異を伴っていなければ、治療効果に影響しない可能性が考えられた。

業務担当者(狩野吉康)

Invader法によるDCV+ASV療法の薬剤耐性と治療効果および耐性ウイルスの有無によるHCV Dynamicsの研究を行った。Invader法(定性)ではY93Hの耐性変異は弱陽性(29.8%)、陽性(17.7%)と従来のdirect sequence法に比較し高率に検出された。治験例(35例)の検討では、Y93Hのdirect sequence検出例、Invader法(定性)陽性例のDCV+ASV療法でのSVR達成は各々71.4%、66.7%とほぼ同等であった。D168E単独の弱陽性7例は全例SVRを達成した。Y93H相対定量ではInvader法(定性)陽性例の1/4は耐性株の存在比率が、Invader法NS5A-Y93H相対定量系で1%未満であった。

Invader 法(定性)D168,L31,Y93 の耐性変異(弱陽性を含む)の有無による HCV dynamics, HCV RNA 陰性化時期に差を認めなかった。Invader 法(定性)による耐性変異弱陽性例では、耐性株の存在比率は低率であり、DCV+ASV 併用への影響は軽微であったことを報告した。

業務担当者(平賀伸彦)

NS3/NS5A 領域の薬剤耐性ウイルスの存在比率と DCV+ASV の治療効果について Invader 法の相対定量系と direct sequence 法、次世代シーケンサー(deep sequence 法)にて検討した。治験症例 31 例での検討では、治療開始時 direct sequence 法では NS3-D168 は全例 wild type、NS5A-L31M 1 例(3.3%)、NS5A-Y93H/F 8 例(26.7%)で耐性ウイルスが検出された。NS5A の耐性ウイルスが認められなかった症例では 100%(21/21)の SVR 率であったが、耐性を認めた症例では 44%(4/9)であった。Direct sequence 法と Invader 法の比較では、NS3-D168 変異検出は同等であった。NS5A-Y93H(定性)の変異検出では感度 95%、特異度 88%であった。Invader 法 NS5A-Y93H 相対定量系での治療効果との関係では、耐性率 50%で分けた場合、感度 93%、特異度 75%であった。さらに Invader 法 NS5A-Y93H 相対定量系と次世代シーケンサーとの比較検討では、 $y = 0.9184x + 5.366$ 、 $R^2 = 0.6982$ で相関を認めた。

業務担当者(瀬崎ひとみ)

DCV+ASV 併用療法の治験症例 63 例で開始時耐性ウイルスの存在と治療効果について検討した。Invader 法 NS5A-Y93H 相対定量系で<1%の場合、98%(42/43)、1-19%で 67%(4/6)、20%以上で 23%(3/13)の SVR 率であった。Invader 法定性 NS3-D168 での陽性例は 1 例であり、direct sequence でも検出された。一方弱陽性例は 16 例認めたが、direct sequence では検出されなかった。Invader 法定性 NS5A-L31 陽性 2 例は direct sequence でも検出されたが、弱陽性 2 例は direct sequence では検出されなかった。Invader 法定性 NS3-D168 で弱陽性例のうち NS5A 領域に変異を認めなかった症例は、全例 SVR であった。保険適応後の症例での DCV+ASV 併用療法の早期治

療効果と NS5A-Y93 耐性変異について研究した。359 例の DCV+ASV 併用療法では、Invader 法の相対定量系で変異のある症例が 7%含まれており、変異の有無を検出できなかった症例は 14%含まれていた。IL28B genotype TT の症例では、NS5A-Y93 の変異を有する症例は 14%であったが、TG/GG では 4.6%であり、TT は TG/GG に比し有意($P=0.019$)に、NS5A-Y93H の変異が高率であった。治療開始後 12 週目までの HCV RNA 陰性化率は、Invader 相対定量系で変異を検出された症例で陰性化が遅い傾向にあった。

Invader 定性法で検出された変異(弱陽性)は、NS3-D168 に関しては治療効果と相関がなく NS5A-Y93 については単独でも治療効果と相関した。今後は、Invader 相対定量系による Y93 変異の測定不能症例において、他の耐性検出法での検討を行う必要があるとともに、実臨床での薬剤耐性変異の有無による最終治療効果との関係を検討していく必要があると報告した。

D. 考察

本研究班では、IFN フリーの新規治療薬である DAAs 治療の効果に関係する NS5A 領域 aaY93H の変異を測定する Invader 法による相対定量系を確立した。この測定系は、従来の PCR-direct sequence 法よりも簡便、安価でかつ定量測定可能な新規検査系である。

この測定系を用いて DCV と ASV 併用療法を施行し SVR 判定可能な 130 例において治療前の血清より Invader 法にて NS5A-Y93H 変異の相対定量測定を行った。治療前 Y93H 相対定量が陰性(変異型混在比率;<1%)であった症例では 97%(92/95)の SVR 率であり非常に高率な効果が得られた。また aaY93H 相対定量値と SVR 率にも相関が認められた。さらに NS3-D168E または NS5A-L31M の変異を認めず、治療前 Y93H 相対定量系が陰性(<1%)であった症例では 100%(92/92)の予測率であり、耐性ウイルス測定の重要性が示された。特に DCV+ASV 治療においては NS5A-Y93 の耐性変異率が 27%で認められており、この領域の測定は治療効果予測に重要である。

一方 PCR Direct-sequence 法での NS5A-Y93H 変異の測定と Invader assay 相対定量測定との測定結果の一致率は 96%(125/130)であった。Direct-sequence 法で耐性

ウイルスが検出されず non-SVR になった 1 例では Y93H 相対定量系で耐性ウイルスが検出され(5%)、Invader 法の有用性が示された。

また Invader 法定性系 NS3-D168E/T/V、NS5A-L31M/V 測定では、陽性例の治療効果との関係は示されたが、弱陽性例では SVR 例が多く認められ今後測定系の改良が必要と考えられた。

来年度以降当研究班は、製造販売後の DCV+ASV 併用療法施行例における耐性ウイルス(NS3-D168E, NS5A-L31M, -Y93H)の有無と治療効果についての多数例での検討が必要である。また DCV+ASV 治療での non SVR 例における耐性ウイルスの長期的推移を新規測定系で検討も行う。またサイクリングプローブ法などの新規測定系の耐性ウイルス検出や DCV+ASV 治療における臨床効果との関係、ペグインターフェロン、リバビリン、DAA(テラプレビル、シメプレビル)治療における non SVR 例での耐性ウイルスの推移を新規測定系で検討する。さらに新たな内服治療(ポリメラーゼ阻害剤を含む)における耐性ウイルスの検出と治療効果との関係についても検討する予定である。

E. 結論

インターフェロンフリーの新規治療薬である DAAs 治療の効果に関する NS5A 領域 Y93H の変異を測定する Invader 法による相対定量系を確立した。この測定系を用いた DCV+ASV 治療の治験症例の成績を解析し、測定系の有用性を認めた。この測定系は、従来の PCR-direct sequence 法よりも簡便、安価でかつ定量測定可能な新規検査系であり、IFN フリーの内服治療(DCV+ASV 等)の効果予測に重要な情報を提供できる。このような新規検査系により治療前の詳細な効果予測が可能となり、C型慢性肝炎治療のガイドライン(「科学的根拠に基づくウイルス性肝炎診療ガイドラインの構築に関する研究」)において研究成果を反映し、診療指針の作成に貢献できると考えられる。

さらには IFN フリーの内服治療などの新規治療薬による効果を予測することにより、効果的な治療法が選択され医療費の削減に寄与する。

また全国的な医療の均てん化に貢献できるものである。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1.学会発表

Clinical utility of NS3/4A protease inhibitor-resistant variant detection for prediction of treatment efficacy in HCV genotype 1. Norio A,Fumitaka S,Yushi S,Taito F,Yusuke K,Hitomi S,Yoshiyuki S,Tetuya H,Masahiro K.Satoshi S,Mariko K,Yasuji A,Kenji I,Hiromitsu K. AASLD 2014/11/11 Boston.

2. C 型慢性肝炎に対する DAAs 併用療法の治療効果
瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光

第 100 回日本消化器病学会総会 2014/4/24 東京

3. ダクラタビル+アスナプレビル 2 剤併用療法の治療効果と治療後長期経過の検討 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光 第 40 回日本肝臓学会東部会 2014/11/27 東京

2. 論文発表

1.田所 健一、鈴木 文孝、小林 万利子、川村 祐介、瀬崎 ひとみ、保坂 哲也、芥田 憲夫、小林 正宏、鈴木 義之、斉藤 聡、荒瀬 康司、池田 健次、熊田博光. PCR-Invader を用いた HCV NS5A 領域 Y93H 変異検出法の開発。肝臓 2014;55:720-722.

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

今回の研究内容については特になし。

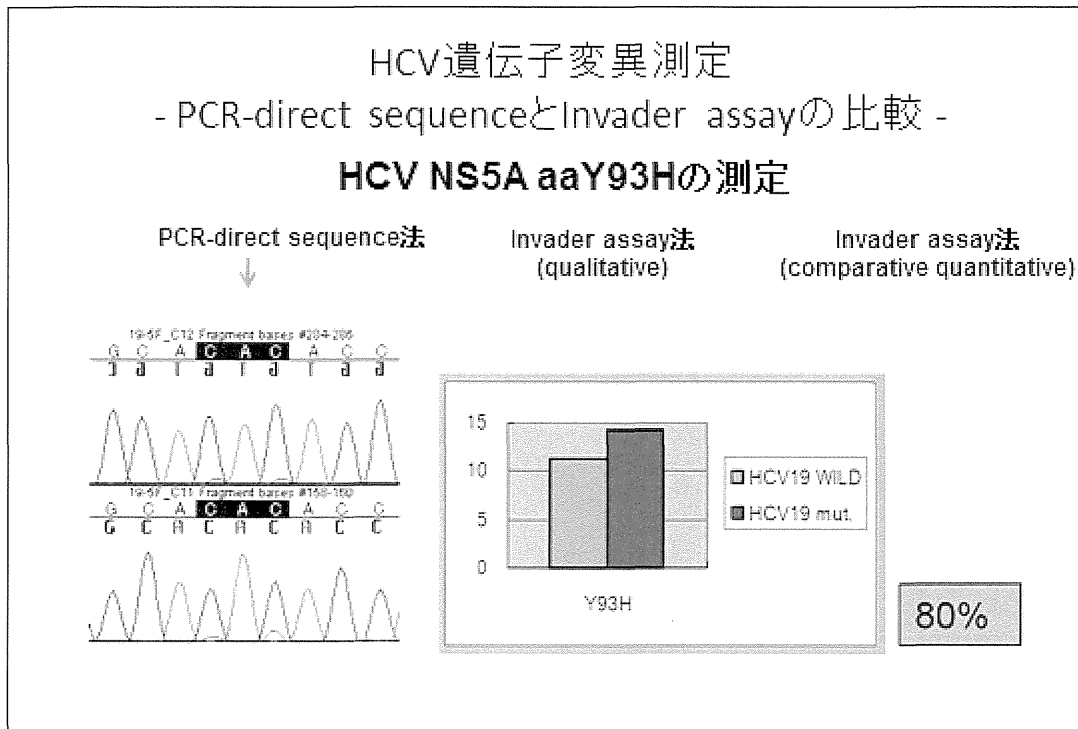
2. 実用新案登録

今回の研究内容については特になし。

3.その他

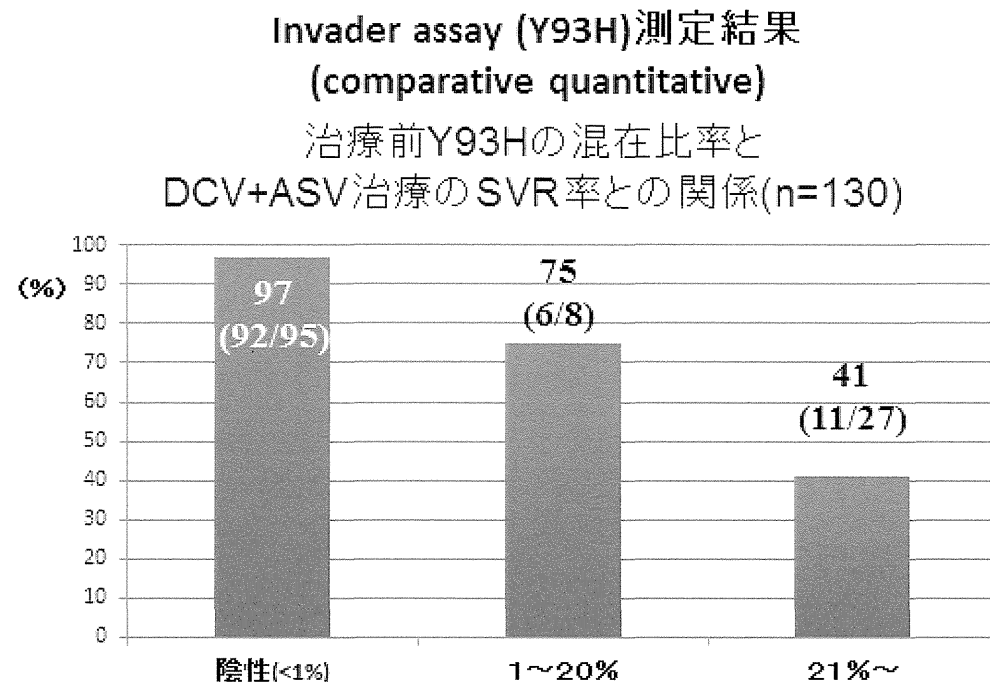
今回の研究内容については特になし。

図1. インターフェロンフリーの新規内服治療(ダクラタシル+アスナプレビル)における治療効果に関する NS5A aaY93H 変異の測定系の確立(定性系と相対定量系)



Invader assay の相対定量系では、耐性ウイルスを定量的に測定可能であった。

図2. ダクラタシル+アスナプレビル治療における治療前 NS5A aaY93H 相対定量系の測定値と治療効果との関係



Invader assay 定量測定系で耐性変異混在比率(<1%)では、高率に SVR が得られ測定の有用性が示された

Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業研究事業）

委託業務成果報告（分担）

DCV/ASV 経口 2 剤治療における耐性変異測定法とその臨床的意義

業務担当者 小松通治 信州大学医学部内科学第二教室 助教
業務協力者 田中榮司 信州大学医学部内科学第二教室 教授
松本晶博 信州大学医学部附属病院肝疾患相談センター 特任准教授
梅村武司 信州大学医学部内科学第二教室 准教授

研究要旨：C 型肝炎に対する抗ウイルス療法は、薬剤の組み合わせにより著効率が異なるため、治療前に奏効率を予測することは、治療選択の際に非常に有用な情報を与える。また新規薬剤として、Direct Acting Antivirals (DAAs) が保険適応となり、ウイルスの薬剤耐性変異を治療前に評価することにより、著効率を予測することが可能となってきた。しかし、薬剤耐性変異の測定は PCR 法等のコストと時間がかかる検査法が必要であり、Invader assay 法の開発により比較的簡便に薬剤耐性変異の測定が可能となっている。

本研究では、Invader assay 法で DAAs に対する薬剤耐性を測定し、治療効果と薬剤耐性変異との関連を評価する。将来的には、次世代シーケンスを用いて Invader assay 法との相関を評価することにより Invader assay 法の有用性も検討する。本年度は、Daclatasvir (DCV) と Asinaprevir (ASV) の経口 2 剤治療を予定している患者 395 例を対象に、これら薬物に対する耐性変異の頻度を検討した。

耐性変異は、NS3 領域では D168、NS5A 領域では L31 と Y93 を測定した。ASV 耐性となる D168 変異は陽性 0.8% (3/395)、弱陽性 17.7% (70/395) であった。DCV 耐性となる L31 変異は陽性 4.3% (17/395)、弱陽性 2.5% (10/395) であり、同じく Y93 変異は陽性 15.7% (62/395)、弱陽性 28.1% (111/395) であった。L31 と Y93 の変異を共に変異を有する症例は認めなかった。

DCV 耐性となる Y93 変異の頻度が高いことは既報と同じであった。D168 と Y93 については弱陽性の頻度が高く、これと治療効果との関連が今後の検討課題の一つである。

A. 研究目的

C 型肝炎の治療としてインターフェロン療法がこれまでの治療の主体であったが、プロテアーゼ阻害薬が保険承認となり、従来の治療に追加することにより、ウイルス排除率が向上した。2014 年 9 月に DAAs が保険承認され、薬剤の開発経緯から C 型肝炎ウイルスに直接作用し、の作用部位が薬剤耐性変異を有することがウイルス排除率に影響することが報告されている。

本研究では、薬剤耐性変異を測定することに薬剤耐性変異の頻度や治療効果に及ぼす影響を検討すること、また次世代シーケンスを用いて薬剤耐性変異を評価することを目的とする。

B. 研究方法

肝臓専門医が勤務している長野県内の 22 施設受診し、Daclatasvir (DCV) と Asinaprevir (ASV) の経口 2 剤治療を希望した C 型肝炎患者を対象とした。耐性変異は、NS3 領域で

は D168、NS5A 領域では L31 と Y93 を Invader assay 法で測定した（ビーエムエル株式会社）。

（倫理面への配慮）

本研究は信州大学医学部倫理委員会の承認を受けた。研究参加者全員にインフォームドコンセントを行い、書面にて同意を取得した。

C. 研究結果

長野県内医療機関において 425 例の症例登録があった。その中で Invader assay 法により、薬剤耐性変異の測定が可能であった 395 例を対象とした。年齢の中央値は 68 歳 (25 歳-84 歳) で男女比は 184 : 211 であった。

ASV 耐性となる D168 変異は陽性 0.8% (3/395)、弱陽性 17.7% (70/395) であった。DCV 耐性となる L31 変異は陽性 4.3% (17/395)、弱陽性 2.5% (10/395) であり、同じく Y93 変異は陽性 15.7% (62/395)、弱陽性 28.1% (111/395) で

あった(図)。L31とY93の変異を共に変異を有する症例は認めなかった。

次世代シーケンスを用いた耐性変異の測定については現在進行中である。

D. 考察

長野県内における薬剤耐性変異の頻度については、陽性を耐性ありと判定するとY93変異が16%と最も高頻度であり、既報と同様であった。NS3領域の変異頻度は低率であるが、NS5A領域の変異頻度は弱陽性も含め4割弱の症例で認められるため、弱陽性例におけるウイルス排除率を明らかにすることは抗ウイルス治療選択に有用な情報をもたらすと考えられた。

現在ほとんどの登録症例がDCV/ASV経口2剤の治療期間中であり、耐性変異と治療効果との関係については検討できていない。長野県では薬剤耐性変異が弱陽性症例においても経口2剤治療を行っており、今後これらの症例のウイルス排除率が注目される。さらに、次世代シーケンスによる解析も予定しており、弱陽性の臨床的意義がより鮮明になることが期待される。

E. 結論

長野県のDCV/ASV経口2剤治療対象症例の耐性変異をInvader assay法で測定した結果、ASV耐性となるD168変異は陽性0.8%、弱陽性17.7%、DCV耐性となるL31変異は陽性4.3%、弱陽性2.5%であり、同じくY93変異は陽性15.7%、弱陽性28.1%であった。L31とY93の変異を共に変異を有する症例は認めなかった。

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

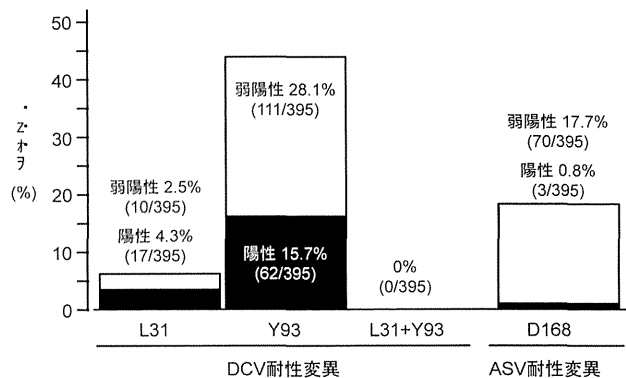


図 治療開始前にみられた経口DS2剤関連耐性変異

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業研究事業）

委託業務成果報告（分担）

HCV 感染末期腎不全患者における DCV/ASV 耐性変異の検討

業務担当者 宇都浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 准教授

研究要旨：透析中の末期腎不全患者の HCV 感染率は、腎機能正常者より高く、末期腎不全患者の生命予後に HCV 関連肝疾患が影響することから、HCV 感染末期腎不全患者に対する抗 HCV 療法が必要である。また、末期腎不全患者では、副作用などの問題から、IFN フリー治療（DCV/ASV 治療など）が必要な HCV 感染患者が多く存在する。しかし、DCV/ASV 治療における薬剤耐性変異や治療効果は十分明らかになっていない。本研究では、HCV 感染末期腎不全患者における DCV/ASV 耐性変異を明らかにすることを目的とした。対象はゲノタイプ 1b の HCV 感染末期腎不全患者 9 例。Direct sequence 法で解析すると、NA5A 領域の Y93H 変異を 1 例（11.1%）認め、Invader 法で解析すると、2 例に Y93H 変異を認めた。NS5A 領域の L31 変異については、Direct sequence 法と Invader 法のいずれも変異を認めなかった。また、Y93H 変異を認めた 1 例では、IFN を含む治療前後に Invader 法で変異率（FOZ 値）を比較したが、差はなかった。NS3 領域についても IFN 治療前後と肝癌発症前後（3 年経過）の 2 つの時期に 2 症例で変異率を解析したが、明らかな変化はなかった。以上のことから、HCV 感染末期腎不全患者の DCV/ASV に対する HCV 薬剤耐性変異の頻度は、腎機能正常 C 型慢性肝炎患者と差はないと考えられた。また、IFN を含む治療や自然経過では HCV 薬剤耐性変異率は変化しないと考えられた。今後、HCV 感染末期腎不全患者の DCV/ASV に対する HCV 薬剤耐性変異、DCV/ASV の効果及び安全性を、多数例で検討する必要がある。

A. 研究目的

透析が導入されている末期腎不全患者の約 1 割が HCV 抗体陽性であり、その HCV 抗体陽性者の約 7 割は HCV RNA が陽性であり、腎機能正常者と比較して HCV 感染率が高いことが知られている。以前は末期腎不全患者の生命予後には HCV 関連肝疾患はほとんど影響しないと考えられていた。しかし、透析導入後の生存期間の改善により、末期腎不全患者の生命予後に HCV 関連肝疾患が影響するようになってきたことから、HCV 感染末期腎不全患者に対する抗 HCV 療法が必要となってきた。末期腎不全患者では、インターフェロン治療による副作用の頻度が高く、リバビリン併用が困難であり、インターフェロンフリー治療（ダクラタスビル DCV/アスナプレビル ASV 治療など）が必要な HCV 感染末期腎不全患者が多く、今後の増加も予想される。しかし、DCV/ASV 治療の有効性や薬剤耐性変異は十分明らかになっていない。また、薬剤耐性変異を検討することは、適切な治療法の選択に重要な情報を提供し、医療費の抑制にもつながることが期待できる。本研究では、HCV 感染末期腎不全患者における DCV/ASV 耐性変異を明らかにすることを目的とした

B. 研究方法

対象は鹿児島大学病院に入院歴のある HCV 感染末期腎不全患者のうちゲノタイプ 1b の 9 症例である。また、腎障害のないゲノタイプ 1b の C 型慢性肝炎 265 例を比較対象とした。すべての症例で、DCV/ASV に対する薬剤耐性変異を Direct sequence 法で解析し、HCV 感染末期腎不全患者は Invader 法を用いた解析も行った。HCV 遺伝子配列の検討は、NS3 領域では V36、T54、Q80、R155、A156、D168、NS5A 領域は L31、Y93 領域を解析した。

（倫理面への配慮）

臨床情報は匿名化してあるものを用い、個人情報保護に努めた。解析結果や臨床情報等は厳重に保管し、解析はネットワークから遮断されたコンピュータを用いた。

C. 研究結果

1) Direct sequence 法で解析すると、HCV 感染末期腎不全患者 9 例のうち NA5A 領域の Y93H 変異を 1 例（11.1%）のみに認めた。一方、腎障害のない C 型慢性肝炎 265 例では 20 例（7.5%）に Y93H 変異を認めた。

- 2) Invader assay 法で解析すると、HCV 感染末期腎不全患者 9 例のうち 2 例に Y93H 変異を認めた。1 例は Direct sequence 法でも変異が検出されていたが、他の 1 例は検出されていなかった。
- 3) NS5A 領域の L31 の部位については、Direct sequence 法と Invader assay 法のいずれも HCV 感染末期腎不全患者では変異を認めず、腎障害のない C 型慢性肝炎 12 例 (4.5%) に L31M/F/V 変異を認めた。
- 4) Y93H 変異を認めた 1 症例では、インターフェロン療法とウイルス除去療法を組み合わせた VRAD 治療前後に Invader assay 法で変異率 (Invader assay 法による FOZ 値) を比較したが、Y93 部位を含めた 8 か所の測定部位では、変異率に明らかな差はなかった。
- 5) NS3 領域については V36、T54、Q80、R155、A156、D168 における変異率を VRAD 治療前後と肝癌発症前後 (3 年経過) の 2 つの時期に 2 症例で解析したが、変異率 (Invader assay 法による FOZ 値) に明らかな変化はなかった。

D. 考察

今回の検討から、HCV 感染末期腎不全患者の DCV/ASV に対する HCV 薬剤耐性変異の頻度は、腎機能正常 C 型慢性肝炎患者と差はないと考えられた。また、VRAD 治療や自然経過では HCV 薬剤耐性変異率は変化しないと考えられた。しかし、今回の検討は症例数が少なく、HCV 感染末期腎不全患者の DCV/ASV に対する HCV 薬剤耐性変異、DCV/ASV の効果及び安全性を、多数例で検討する必要があると考えられた。

E. 結論

HCV 感染末期腎不全患者の DCV/ASV に対する薬剤耐性変異の頻度は、腎機能正常 HCV 感染者と差はないと考えられた。治療効果に差がないかは今後の検討課題である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oda K, Uto H, Kumagai K, Ido A, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, Tanaka Y, Nishida N, Tokunaga K, Tsubouchi H. Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in patients positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan. J Med Virol. 2014; 86: 1877-1885.
- 2) Tokunaga M, Uto H, Oda K, Tokunaga M, Mawatari S, Kumagai K, Haraguchi K, Oketani M, Ido A, Ohnou N, Utsunomiya A, Tsubouchi H. Influence of human T-lymphotropic virus

type 1 coinfection on the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. J Gastroenterol. 2014; 49: 1567-1577.

2. 学会発表

- 1) 今村也寸志、宇都浩文、平峯靖也、伊集院翔、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. 人間ドック受診者における血清 ALT 異常とメタボリック症候群との関連. 第 100 回日本消化器病学会総会、東京都、2014 年.
- 2) 馬渡誠一、森内昭博、大重彰彦、梶 一晃、梶恵理子、室町香織、小田耕平、今中 大、熊谷公太郎、玉井 努、宇都浩文、桶谷 眞、坪内博仁、井戸章雄. 当科におけるシメプレビル 3 剤併用療法の有効性と安全性の検討. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京都、2014 年.
- 3) 梶 一晃、玉井 努、小田耕平、梶恵理子、大野香織、大重彰彦、今中 大、熊谷公太郎、馬渡誠一、森内昭博、宇都浩文、桶谷 眞、井戸章雄. AFP 低値例における高感度 AFP-L3% 高値は肝発癌に寄与する因子である. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京都、2014 年.
- 4) 馬渡誠一、森内昭博、玉井 努、大西容雅、坂江 遥、室町香織、小田耕平、大重彰彦、宇都浩文、井戸章雄. 当科における肝細胞癌治療後のインターフェロン療法の予後の検討. 第 104 回日本消化器病学会九州支部例会、北九州市、2014 年.

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
なし。

厚生科学研究委託費（肝炎等克服緊急対策研究事業）

委託業務成果報告（分担）

次世代シーケンス技術を用いた DAA 耐性変異 HCV の検出

業務担当者 前川伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

研究要旨：近年、C型肝炎ウイルス（HCV）に対して、顕著な抗ウイルス効果を示す多数の DAA (direct antiviral agent) が開発され、これらの組み合わせによる様々な臨床試験が進み、また一部の DAA においてはすでに臨床の場にも用いられつつある。一方で、DAA 治療においては耐性変異の出現が問題となっている。すなわち DAA は HCV の特定の限られたウイルス領域をターゲットとしており、異なる DAA 間で交差耐性を示す多剤耐性変異出現が容易に起こりうることに懸念されている。

このような多剤耐性変異 HCV の問題克服に向けて、本研究では deep sequence、direct sequence の手法を用いて、DAA 耐性 HCV の臨床意義について明らかとすべく。さらには高感度かつ簡便な耐性 HCV 検出系を確立することを目指してゆく。H26 年度においては、DAA 未投与症例における NS5A 阻害剤耐性のプロファイル解析にて、特に NS5A-Y93 番変異が多く混在すること、さらに NS5A 阻害剤耐性変異は IL28B SNP major type (TT) 症例に多く、内因性インターフェロンと耐性変異の関連することを示した

また deep sequence との比較における direct sequence の Y93H 変異検出の感度・特異度について明らかとした。

A. 研究目的

近年、C型肝炎ウイルス（HCV）に対して、顕著な抗ウイルス効果を示す多数の DAA (direct antiviral agent) が開発され、これらの組み合わせによる様々な臨床試験が進み、また一部の DAA においてはすでに臨床の場にも用いられつつある。一方で、DAA 治療においては耐性変異の出現が問題となっている。すなわち DAA は HCV の特定の限られたウイルス領域をターゲットとしており、異なる DAA 間で交差耐性を示す多剤耐性変異出現が容易に起こりうることに懸念されている。

HCV は遺伝子変異を高頻度に起こし宿主体内において複雑な変異体の集合 (quasispecies) を形成しているが、DAA 耐性変異 HCV の解析においても、quasispecies の詳細な解析を通じた検討は不可欠と考えられる。

このような多剤耐性変異 HCV の問題克服に向けて、本研究では近年大きく進歩した deep sequence の手法を用いて、DAA 耐性 HCV の臨床意義について詳細に明らかとすべく。その一方で、高感度かつ簡便な耐性 HCV 検出系を確立することを目指してゆく。

B. 研究方法

1) NS5A 領域の daclatasvir 耐性変異の検討：

Daclatasvir 未投与の genotype 1b HCV 110 症を対象とし (IFN 無治療症例 59 例、PEG-IFN/RBV 併用療法後 relapser 30 例、null-responder 21 例)、NS5A 領域の daclatasvir 耐性変異を deep sequencer を用いて解析した。

(2) NS3 領域におけるプロテアーゼ阻害剤耐性変異の検討：PEG-IFN/RBV/テラプレビル 3 剤併用療法を導入した genotype 1b、高ウイルス量

の C 型慢性肝炎患者 34 例。男性/女性=16/18 例、平均年齢 56.7 歳、初回治療/再治療=20/14 例、core70 変異 R/nonR=24/10 例、IL28B: TT/TG or GG=25/9 例。治療前、治療後の血清を用い deep sequence を行った。

(3) NS5A-Y93H の検出に関して、deep sequence とダイレクトシーケンスを同時に行った 80 症例に注目し、Deep sequence を基準とした場合のダイレクトシーケンスの感度と特異度について検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行においては山梨大学倫理委員会等に必要の申請を行い、各種倫理指針を遵守して施行している。

C. 研究結果

(1) NS5A 耐性変異として知られている Y93H と

L31M/V/F 耐性変異を有意に認められた症例は、全体では 13/110(11.8%)、34/110(30.9%)であった。Y93H と L31M/V/F 耐性変異を同時に持つ頻度は deep sequence の結果、4/110(3.6%)であった。これらの NS5A 耐性の臨床的因子との関連性を調べたところ、Y93H は単変量解析で IFN 治療効果と関連がある core aa70、IRRDR、IL28B SNP と有意に関連があった。また、多変量解析の結果、IL28B SNP major type(TT)では NS5A 93 番耐性変異を有意に多く認めた ($p=0.042$)。

(2) 34 例中 SVR を達成しなかったのは 8 例 (23.5%)であった。うち訳は、副作用中止 3 例、breakthrough1 例、再燃 2 例、NVR2 例であった。non-SVR8 例中 5 例 (62.5%) で明らかな耐性変異を有したと考えられた。2 例で治療前に耐性に関与したと考えられる変異を認め (T54A:2 例)、ウイルス増加時にその変異率が増加し、4 例で経過中に新たな耐性変異が出現した (V36C、T54A、A156F、A156S 各 1 例)。

耐性変異が同定できた 5 例中 3 例 (T54A:2 例、A156F:1 例) では TVR 投薬終了後耐性変異の比率は減少傾向となったが、2 例 (V36C、A156S 各 1 例) では 3 か月以上高度に耐性変異の比率が持続した。

系統樹解析では 8 例中全例で治療前にマイナークローンであったものが治療介入によってメジャークローンになっていた。そのうち 7 例はその後も遺伝的系統を維持しており、1 例は治療前のメジャークローンに戻っていた。

(3) Deep sequence で Y93H (変異型) を 25%以上混在すると判定された症例は全例 direct sequence で検出可能であった。一方、deep sequence で Y93H の混在が 25%未満の場合には direct sequence での検出感度は 40%であった。しかしながら direct sequence で Y93H の混在が検出された症例は deep sequence でも Y93H の混在を認めており、direct sequence による Y93H の混在診断の特異性は高かった。

D. 考察

NS5A 阻害剤において、Daclatasvir 未投与症例では NS5A 93 番変異が多く混在することが明らかになった。また変異例において IL28B SNP major type が有意に多く、PEG-IFN/RBV 併用療法効果の高い IL28B SNP major type において daclatasvir 耐性が出現しやすい可能性が示唆された。NS3 阻害剤においては、治療終了後耐性変異が長期に残存する例も存在し、治療介入でメジャークローンが変わりその系統が維持される傾向にあった。今後の DAA 治療の影響を与える可能性があり、導入に際しては考慮する必要があると考えられた。耐性変異検出に関して、簡便に測定可能な direct sequence 法は有用な方法であることが明らかとなった一方で、その感度に関してはさらなる方法の確立が必要なが考えられた。

E. 結論

本年度の検討により、ウイルスゲノムの混在状態を詳細に検討することで以下のことが明らかとなった。

● NS3 阻害剤については、高度耐性の HCV が当初より存在する可能性は低く、わずかな NS3 阻害剤の耐性が臨床的な耐性に発展する可能性は低いことが考えられた。

● 一方、NS3 阻害剤耐性は出現後一定期間、宿主に残存することが示されたが、臨床的耐性との関連はさらなる検討が必要と考えられた。

● NS5A 阻害剤耐性 HCV は治療前から一定の頻度で存在し、また宿主の IL28B とも関連することが示された。

● 耐性 HCV 検出において、精度は高いが手技の煩雑な deep sequence、簡便なもの感度に劣る direct sequence 両方の欠点を補う新たな変異検出システムが望まれること。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K. Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J Virol.* 2014 Nov 15;88(22):13352-66.
- 2) Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Liver stiffness measurement for risk assessment of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014 Jun 24. doi: 10.1111/hepr.12377. [Epub ahead of print]
- 3) Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* 2014 Feb 25. doi: 10.1111/hepr.12316. [Epub ahead of print]
- 4) Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res.* 2014 Dec;44(13):1339-1346.
- 5) Maekawa S, Enomoto N. Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2014 Jan;49(1):163-4.

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