

厚生科学研究委託費（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

研究テーマ名：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

研究分担者：氏名 荒井邦明 所属 金沢大学附属病院消化器内科 役職 助教

研究要旨：C型慢性肝炎に対するNS3/4A阻害剤アスナプレビルとNS5A阻害剤ダクラタスビルによる経口抗ウイルス療法の治療効果予測に関しては、治療開始前に両薬剤の耐性ウイルスが存在するとウイルス排除率が低下することが報告されている。しかしながら、耐性ウイルスの適切な測定法、さらに測定結果の解釈に関しては未だ明らかになっていない。今回当院にて第3相試験を実施した5例に関して耐性ウイルスの有無、および治療失敗例2例に関しては、長期の耐性ウイルスの推移を、invader法、direct sequence法において検討した。その結果以下の事が明らかとなった。NS5A Y93H変異に関して、invader相対定量法は、direct sequence法では検出困難な10～20%のpopulationを検出可能であり、治療効果予測に有用と考えられた。治療開始前のNS3とNS5A両部位における耐性変異ウイルスの存在は治療不成功に関わる可能性が考えられた。治療失敗例においては治療後長期間耐性ウイルスが残存することが明らかとなった。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変異を伴っていないければ、治療効果に影響しない可能性が考えられた。いずれも少数例での知見であるため、今後多数症例においてもさらなる検討を行う予定である。

A. 研究目的

2014年9月よりC型慢性肝炎に対するNS3/4A阻害剤アスナプレビルとNS5A阻害剤ダクラタスビルによる経口抗ウイルス療法が可能となった。本邦において実施された第2相、第3相の臨床試験の結果から、治療前にアスナプレビル、ダクラタスビルに対する耐性ウイルスが存在した場合、ウイルス排除率が低下することが示唆されている。そのため日本肝臓学会および厚生労働省の研究班のC型慢性肝炎のガイドラインでは治療前に耐性ウイルスの測定を行うことを強く推奨している。しかしながら、治療前に耐性ウイルスが存在してもウイルスが排除される症例も存在する。また、耐性ウイルスの測定法も複数存在し、それぞれの測定結果と治療効果との関連に関しても不明な点が多い。今回、当院において第3相試験を施行した5症例を対象として、治療前の耐性ウイルスの有無をinvader法とDirect sequence法において測定し、その治療効果との関連を検討した。また治療不成功となった2症例に関して、治療終了後のウイルス配列の推移も検討した。

B. 研究方法

金沢大学附属病院ではアスナプレビル・ダクラタスビルの第3相試験を5例実施した。これらの症例の治療前のNS3領域、NS5A領域の耐性ウイルスの有無を、invader法およびDirect sequence法において解析した。NS3領域に関しては、V36D、T54A/S、Q80L/R、R155K/Q/T、A156S/T/V、D168A/E/H/T/V、NS5A領域に関して

はL31F/M/V、Y93Hの有無をinvader定性法（陰性、弱陽性、陽性）で検討した。NS5A Y93Hに関してはinvader相対定量法を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は当院倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

下記に症例の詳細を示す。

【症例1 59歳男性、IFN不耐容】

治療前：Invader定性法 NS3 D168A/E 弱陽性、invader相対定量法 NS5A Y93H 14%、direct sequenceでは耐性ウイルスは認めなかった。

経過：4週目でウイルス陰性化するも10週目で陽転化。12週目ブレークスルーと判断して治療中止となった。

中止後：中止後108週まで観察しえた。NS5A Y93Hに関しては中止後6週、12週、36週といずれも99%、58週で83%、108週で42%検出された（invader相対定量法）。NS5A L31M、NS3 D168Eに関しては、中止後6週後から108週まで陽性（invader定性法）、NS5A L31Vに関しては、108週目のみ弱陽性（invader定性）であった。

またinvader法で陽性であった変異は、全てdirect sequence法でも検出可能であった。

【症例2 28歳女、IFN不適格】

治療前：Invader定性法にてNS3 D168A/T/V 弱陽性であった。Y93H、L31M/Vに関してはinvader法（定性、相対定量法）において検出されなかった。direct sequenceでは耐性ウイルスは認

めなかった。

経過: 他院にて処方 Tegretol 内服を希望。併用禁忌薬の規定により服用開始 2 週間で内服中止となった。

中止後: 中止後 109 週まで観察しえた NS5A Y93H に関しては中止後 10 週で 24%、22 週で 4%、46 週で 1%、52 週で 21%、109 週で 11%陽性であった (invader 相対定量法)。NS5A L31M に関しては、中止後 10 週、22 週、46 週で陽性、52 週、109 週で弱陽性であった (invader 定性法)。NS5A L31V に関しては中止後 10 週、22 週、46 週で陽性、52 週で弱陽性、109 週で弱陽性であった (invader 定性法)。また治療前に invader 定性法にて弱陽性であった NS3 変異に関しては、中止後 10 週で D168A/T/V 弱陽性、22 週、26 週で検出されず、52 週で D168A/T/V 弱陽性、109 週でいずれも検出されなかった (invader 定性法)。Direct sequence 法では、NS5A Y93H に関しては、invader 相対定量法にて 21%以上、また NS5A L31M/V に関しては、invader 定性法で陽性であった変異は、direct sequence 法でも検出可能であった。

【症例 3 36 歳男性、IFN 不適格】

治療前: Invader 定性法にて NS3 D168E 弱陽性であった。Direct sequence 法では変異は検出されなかった。

経過: SVR。

【症例 4 59 歳女性、IFN 不耐容】

治療前: Invader 相対定量法 NS5A Y93H 1%で検出された。NS3 T54S、Q80L が invader 定性法で陽性であった。尚 NS3 T54S、Q80L のいずれも direct sequence 法でも検出された。

経過: SVR。

【症例 5 62 歳女性、IFN 不適格】

治療前: Invader 相対定量法で NS5A Y93H 1%陽性であった。Invader 定性法にて NS3 T54S 陽性、L31M 弱陽性であった。Direct sequence 法では T54S、Q80L、L31M 陽性であった (Invader 定性法では検出されなかった Q81L が direct sequence 法では検出された)。

経過: SVR。

D. 考察

1. NS5A Y93H 変異に関して、invader 相対定量法は、direct sequence 法では detection 困難な 10~20%の population を検出可能であり、治療効果予測に有用と考えられた (症例 1)。
2. 治療開始前の NS3 と NS5A 両部位における耐性変異ウイルスの存在は治療不成功に関わる可能性が考えられた (症例 1)。
3. 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考えられた (症例 2)。
4. 治療失敗例においては治療後長期間耐性ウイルスが残存することが明らかとなった (症例

1、2)

5. 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 (症例 3、4、5)。

5. Direct sequence 法と invader 定性法の比較では、invader 定性法で陽性であれば direct sequence 法においても検出可能であった。

6. Invader 定性法では検出されなかったが direct sequence においてのみ検出される変異が存在した (症例 5、NS3 Q80L)。

E. 結論

5 例と少数例の検討ではあるが、再燃による治療失敗例においては invader 相対定量法において 14%の NS5A Y93H を認めた。この変異は direct sequence 法では検出されておらず、NS5A Y93H invader 相対定量法治療効果予測に有用と考えられた。また治療開始前の NS3 変異ウイルスの存在と治療効果との関連に関してはさらなる症例の蓄積が重要と考えられた。

F. 健康危険情報

健康危険情報に該当する有害事象は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takamura H, Nakanuma S, Hayashi H, Tajima H, Kakinoki K, Kitahara M, Sakai S, Makino I, Nakagawara H, Miyashita T, Okamoto K, Nakamura K, Oyama K, Inokuchi M, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Fujimura T, Onishi I, Kayahara M, Tani T, Arai K, Yamashita T, Yamashita T, Kitamura H, Ikeda H, Kaneko S, Nakanuma Y, Matsui O, Ohta T. Severe veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome after deceased-donor and living-donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014 Dec, 46(10) 3523-35.
- 2) Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. *Hepatol Res.* 2014 Nov, 44(12) 1179-85.
- 3) 石田晃介, 堀井里和, 山下竜也, 荒井邦明, 山下太郎, 加賀谷尚史, 酒井佳夫, 水腰英四郎, 本多政夫, 金子周一. 副腎皮質シンチグラフィが有用であった肝 adrenal rest tumor の 1 例. *日本消化器病学会雑誌* 2014 Oct. 111 巻 10 号 2004-2012
- 4) Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, Arai K, Kitamura

- K, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. *Hepatol Res.* 2014 Oct 16. [Epub ahead of print]
- 5) Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, Honda M, Kaneko S. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2014 Sep 15. [Epub ahead of print]
- 6) Nakamura M, Kondo H, Tanaka A, Komori A, Ito M, Yamamoto K, Ohira H, Zeniya M, Hashimoto E, Honda M, Kaneko S, Ueno Y, Kikuchi K, Shimoda S, Harada K, Arai K, Miyake Y, Abe M, Taniyai M, Saibara T, Sakisaka S, Takikawa H, Onji M, Tsubouchi H, Nakanuma Y, Ishibashi H. Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* 2014 Sep 14. [Epub ahead of print]
- 7) Ooka Y, Chiba T, Ogasawara S, Arai K, Suzuki E, Tawada A, Yamashita T, Kanai F, Kaneko S, Yokosuka O. A phase I/II study of S-1 with sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs.* 2014 Aug, 32(4) 723-8.
- 8) Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, Honda M, Kaneko S. P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 May, 63(5) 479-89.
- 9) Takeshita Y, Takamura T, Honda M, Kita Y, Zen Y, Kato K, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. *Diabetologia.* 2014 May, 57(5) 878-90.
- 10) Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with

different interleukin-28B genotypes. *Hepatology.* 2014 Mar, 59(3) 828-38.

- 11) 荒井邦明, 金子周一. 【臨床医学の展望 2014】 肝臓病学 日本医事新報 2014 Mar 4688号 26-33
- 12) 荒井邦明, 山下竜也, 金子周一. 肝がん: 診断と治療の進歩 IV. 診療ガイドラインの進歩 3. サーベイランスのガイドライン (治療後も含む) 日本内科学会雑誌 2014 Jan 103(1) 37-43
- 13) 山下竜也, 荒井邦明, 金子周一. 肝がん: 診断と治療の進歩 VI. 治療法の進歩 5. 化学療法 日本内科学会雑誌 2014 Jan 103(1) 102-109,
- 2. 学会発表**
- 1) 荒井邦明, 山下竜也, 松田昌悟, 堀井理和, 北原征明, 砂子阪肇, 金子周一. 転移性肝腫瘍に対するラジオ波焼灼療法 (RFA) の治療成績を踏まえた RFA の適応. 第 22 回日本消化器関連学会週間 (JDDW) 神戸 2014
- 2) 荒井邦明, 山下竜也, 清島淳, 堀井里和, 上田晃之, 北原征明, 砂子阪肇, 金子周一. 肝細胞癌に対する CelonPOWER を用いた TACE 先行 RFA. 第 33 回東京肝癌局所療法研究会 東京 2014
- 3) 荒井邦明, 山下竜也, 金子周一. BCLC Stage C におけるソラフェニブの使い方 動注療法との使い分け、コンビネーション. 第 10 回日本肝癌分子標的治療研究会 兵庫県淡路 2014
- 4) 荒井邦明, 山下竜也, 金子周一. Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 低信号結節における動注 CT の活用. 第 50 回日本肝癌研究会 京都 2014
- 5) 荒井邦明, 堀井里和, 北原征明, 砂子阪肇, 山下竜也, 金子周一. CAP (controlled attenuation parameter) による肝内脂肪蓄積量の定量化. 第 50 回日本肝臓学会総会 東京 2014
- 6) 荒井邦明, 堀井里和, 北原征明, 砂子阪肇, 山下竜也, 金子周一. フィブロスキャンによる慢性肝疾患の肝予備能の推定. 第 87 回日本超音波医学会 横浜 2014
- 7) 荒井邦明, 山下竜也, 金子周一. Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 低信号結節における動注 CT の診断意義. 第 100 回消化器病学会総会 東京 2014

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
特記事項なし

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。