

# 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

## 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

研究分担者 平賀 伸彦 広島大学病院消化器・代謝内科 特任助教

研究要旨：C型慢性肝炎患者に対する Direct-acting antiviral agents (DAAs)の組み合わせた IFN フリー治療では薬剤耐性変異の存在によって治療効果が影響される。従来の薬剤耐性変異検出は PCR-direct sequence 法や存在比率は次世代シーケンサーによって行われてきたが時間が掛かり費用も高額となることが問題であった。今回開発された Invader assay 法は、薬剤耐性検出をより簡便に安価に測定できるが、有用性の確認が必要であった。そこで、当院で DAA 治療の行われた 31 例を対象に Invader assay 法による薬剤耐性の検出を行った。PCR-direct sequence 法で検出した NS3 および NS5A 薬剤耐性変異症例は、Invader assay 法でも全例検出した。また、NS5A 薬剤耐性変異の耐性ウイルス量（混在比）は次世代シーケンサー法の結果と Invader assay 法の結果は強い相関を認めた。さらに、Invader assay 法による SVR の正診率は 90%であった。これらの結果から、C型慢性肝炎患者の DAA 治療前に Invader assay 法による薬剤耐性変異の検出は有用であることが示された。

### A. 研究目的

近年 C 型肝炎の治療としてウイルス蛋白を直接阻害する Direct acting antivirals (DAAs) を組み合わせた IFN フリーの治療によってウイルス排除が可能となった。一方 IFN フリーの治療では、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。従って、これらの領域の遺伝子変異を治療前に把握することは、治療効果の予測を可能にするとともに治療法の選択に必要である。しかし現在の遺伝子測定は、主として PCR-direct sequence 法で行われているが、検査費用が高いことや測定に時間がかかること、少量の変異ウイルスを検出できないことから、一般臨床での使用に問題がある。本研究は、耐性ウイルスの測定系として、より簡便で定量も可能である Invader assay 法を行い、従来方法の PCR-direct sequence 法、更に次世代シーケンサー法による解析を比較し有用性を検討する。

### B. 研究方法

DAA 併用療法を行い、治療効果判定が可能な C 型肝炎の 31 例の保存血清から HCV を抽出し、NS3 および NS5A 薬剤耐性変異について Invader assay 法、PCR-direct sequence 法、次世代シーケンサー法による解析を行った。

得られた Invader assay 法の結果と PCR-direct sequence 法の結果を比較し、耐性変異検出の有用性を検討した。

更に、耐性ウイルス量（混在比）の検出について、Invader assay 法の結果と次世代シーケンサーによる結果を比較検討した。

最後に、Invader assay 法の結果と治療効果について検討した。

（倫理面への配慮）

過去に保存された血清を用いる為、対象者に対して予測される身体的な危険・不利益はないと考えられる。試料の匿名化、やり取りの際には個人情報が出ることがないように十分配慮する。

### C. 研究結果

1) Invader assay 法と PCR-direct sequence 法の変異検出の比較

NS3 耐性変異について：PCR-direct sequence 法にて 31 例中 1 例に耐性変異を認め、Invader assay 法にて 1 例も検出した。

NS5A 耐性変異について：PCR-direct sequence 法にて 8 例の変異型を認めたが、耐性変異 Y93H は 7 例に認め、Invader assay 法にて 7 例も同様に Y93H 変異症例を 7 例検出した。のこり 1 例は Y93F であり薬剤耐性変異ではなく、Y93H を検出する Invader assay 法では陰性であった。

2) 耐性ウイルス量（混在比）について次世代シーケンサー法と Invader assay 法との比較

NS5A 耐性変異の Y93H 変異の耐性ウイルス量について Y93F 変異症例を除いた 30 例にて次世代シーケンサー法による結果と Invader assay 法による存在比率を比較検討したところ、相関係数は  $R^2 = 0.899$  であった。

3) Invader assay 法の結果と治療効果判定

Invader assay による陽性 vs 陰性/弱陽性による判定による SVR 症例と非 SVR 症例での感度・特異度・正診率は、95%、40%、77%であった。

Invader assay 法による存在比率を 50%未満と以上の 2 群に分けた場合、SVR 症例と非 SVR 症例での感度・特異度・正診率は、93%、75%、90%であった。

#### D. 考察

NS3 および NS5A 薬剤耐性変異の検出は、既存の測定法である PCR-direct sequence 法と Invader assay 法は同等であり、耐性ウイルス量（混在比）の検出も、次世代シーケンサー法の結果と Invader assay 法の結果は強い相関を認めたことから、耐性変異検出についてより簡便で安価である Invader assay 法が有用であると思われた。また、治療効果判定においても Invader assay 法による正診率は 90%であり、治療方針の決定に有用であると思われた。

#### E. 結論

Invader assay 法による薬剤耐性変異の検出に有用である。

#### F. 健康危険情報 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultradeep sequencing study of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with daclatasvir, peginterferon, and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2105-12.

##### 2. 学会発表

1) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HCV 感染阻害薬の検討、第 50 回 日本肝臓学会総会、東京、2014

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし。



## 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。