

厚生科学研究委託費(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
分担研究報告書

DCV/ASV 療法における薬剤耐性と治療効果

分担研究者 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

研究要旨; Genotype 1b型、高ウイルス量のC型慢性肝炎に対するDCV+ASV併用療法は、国内第2/3相試験の結果より、NS5A-Y93耐性変異の検出はDirect sequence法、Invader定性法および変異相対定量法いずれも治療効果とよく相関することがわかった。一方、Invader assay法のNS3-D168定性法での弱陽性例は陰性例とほぼ同等の高い治療効果が得られており、耐性検出の有無で治療効果の予測は困難であると考えられる。またNS5A-L31定性における変異陽性例は、同時にNS5A-Y93の変異の有無が治療効果に影響する可能性があると思われるが、変異陽性例が少ないため症例数が増えた段階で再評価を要するものと考えられた。実臨床におけるDCV+ASV併用療法では、Invader法の変異相対定量法で変異のある症例が7%含まれていた。治療開始後12週目までの早期のHCV RNA陰性化率は、Invader変異相対定量法での変異型比率が治療早期の陰性化率に関係する傾向があったが、最終治療効果との関係について今後評価していく必要がある。一方で、Invader法により耐性の有無を検出不能であった症例も14%含まれており、これらの症例においてはdirect sequence法での再評価が望ましく、今後最終治療効果との関連を評価する必要がある。

A. 研究目的

2014年7月に本邦において初となるIFN-freeの経口抗ウイルス剤であるダクラタスビル(DCV)とアスナプレビル(ASV)2剤併用療法が製造販売承認された。これにより、より多くの症例にHCV排除を目指した治療の道が開かれることとなった。一方で、これらの薬剤に耐性を有するウイルスに対しては治療効果が低下することもわかっている。しかしながら、薬剤耐性の検出法は各種存在し、いずれの方法がより臨床に即し、治療成績と相関するかは明らかにされていない。そこで、各検査法による薬剤耐性の検出頻度とDCV/ASV併用療法の治療成績との関係を検討することを目的とした。

B. 研究方法

当院において、Genotype 1b型、高ウイルス量のC型慢性肝炎を対象とした国内第2/3相試験を行った63例で、治療開始前のHCV NS3領域

のaa168番(NS3-D168)、NS5A領域のaa31番(NS5A-L31)、aa93番(NS5A-Y93)の薬剤耐性変異をdirect sequence法およびInvader assay法定性法を用いて測定した。NS5A-Y93については、変異相対定量法にて変異相対比率も算出した。各種検査法の耐性検出率を比較し、最終治療効果(SVR率)との関係と検討した。

さらに、DCV/ASV併用療法の実臨床において、NS5A-Y93の耐性変異の有無をInvader法の変異相対定量法にて測定した359例で、変異型比率の分布を検討し、開始後12週目までの早期HCV RNA陰性化率を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、副作用、患者に関する個人情報・守秘義務、患者の権利保護等について説明し、同意を文章または口頭にて取得し研究を行った。

C. 研究結果

(1) DCV+ASV併用療法国内第2/3相試験

における薬剤耐性から見た治療成績

当院で治験を行ったのは 63 例であり、男性 23 例、女性 40 例、年齢中央値は 65 歳であった。Direct sequence 法で薬剤耐性変異を測定すると、NS3-D168 の変異が 1 例 1.6%、NS5A-L31 の変異が 1 例 1.6%、NS5A-Y93 の変異は minor な変異を有する(Y93Y/h)のが 11 例 17.5%、major な変異を有する(Y93H/y、Y93H)のは 8 例 12.5%であった。

治療時期別の HCV RNA 陰性化率を Y93 の変異の有無別に検討すると、治療中の陰性化率は Y93 変異の有無によらず同等であった。しかしながら、終了後 24 週の SVR 率は全体が 77.8% (49/63)の内 Y93 変異がなければ 93%(41/44)であったのに対し、Y93Y/h は 64%(7/11)、Y93H/y および Y93H は 13%(1/8)という結果であった。

次に、治療前の薬剤耐性変異の頻度を Invader 法で測定し、direct sequence 法と比較した。NS3-D168 は Invader 法で陽性と判定された症例は direct sequence 法でも major peak で陽性であった。一方、弱陽性と判定された症例は 16 例 25.4%にみられたが、いずれも direct sequence 法では耐性を検出されなかった。NS5A-L31 は Invader 法で陽性と判定されたのは 2 例 3.2%であり、この内 1 例は direct sequence 法で変異が major peak で検出され、もう 1 例は minor peak で検出された。弱陽性と判定された 2 例は、direct sequence 法では検出されなかった。

NS5A-Y93 は、Invader 定性法で陰性が 48 例 76.2%、陽性が 9 例 14.3%、弱陽性が 6 例 9.5%であった。Direct sequence 法と比較すると、陰性であった症例のうち 2 例が major peak で、3 例が minor peak で変異が検出された。一方、弱陽性であった症例のうち 1 例が direct sequence 法で耐性を検出されなかった。NS5A-Y93 の変異相対比率で見ると、1%未満が 44 例 69.8%、1-19%が 6 例 9.5%、20-98%が 13 例 20.7%であり、99%以上の変異を認めた症例はなかった。Direct sequence と比較すると、変異比率が 1%未満の症例のうち 1 例が minor peak で変異を検出

され、一方 1-19%の変異を検出された症例のうち 1 例が direct sequence では検出されなかった。

続いて、治療開始前にいずれかの測定法で薬剤耐性が検出された症例の治療効果を検討した。まず、direct sequence 法では耐性変異は陰性であったが、Invader assay 法にて耐性が検出された症例 15 例の内、NS3-D168 が Invader 定性で単独弱陽性の 13 例、NS5A-Y93 が単独弱陽性であった 1 例は SVR となった。Y93 の変異型比率が 5%検出された 1 例が再燃した。次に direct sequence 法にていずれかの部位に minor peak の変異を検出された症例 12 例では、NS5A-Y93Y/h の 11 例のうち、Invader 定性で陰性であった症例 3 例は SVR、弱陽性であった症例は 4 例中 3 例が SVR である一方、定性陽性と判定された症例は 4 例中、変異型比率 36%の症例と 69%の症例 2 例が non SVR であった。NS5A-L31L/m の 1 例は Invader 定性では陽性と判定されたが SVR であった。Direct sequence 法でいずれかの部位に major peak で耐性を検出された症例 9 例は、NS3-D168 が direct sequence でも Invader 法でも陽性と判定された 1 例は再燃し、NS5A-Y93H/y あるいは Y93H の 8 例は、Invader 定性陰性で変異型比率 65%検出の 1 例のみが SVR となった他は、全例 non SVR であった。NS5A-L31 については単独で major 耐性を検出された症例はなく NS5A-Y93 とともに陽性の 1 例が non SVR であった。

以上より、Invader 法による各薬剤耐性の有無と SVR 率についてまとめると、NS3-D163 の変異の有無による SVR 率は、陰性例 80%(36/45)と弱陽性例 81%(13/16)と同等であり、同時に NS5A に耐性を検出された症例を除外すると、陰性例 94%(30/32)、弱陽性例 100%(13/13)であった。Invader 法で陽性の 1 例は direct sequence でも陽性であり、non SVR であった。NS5A-L31 では、Invader 定性で陰性例は 81%(47/58)、弱陽性、陽性例はいずれも 50%(1/2)であった。この non SVR の 2 例とも同時に NS5A-Y93 が Invader 法で陽性および direct sequence 法で major の変異を

検出されていた。NS5A-Y93 では、Invader 定性法で陰性であれば94%(44/47)がSVRとなったが、弱陽性では50%(3/6)、陽性では22%(2/9)とSVR率は低下した。変異相対定量法でも、1%未満は98%(42/43)がSVRとなったのに対し、1-19%は67%(4/6)、20-98%は23%(3/13)と低下した。

(2) DCV+ASV 併用療法の実臨床における早期治療効果とNS5A-Y93 耐性変異

当院における実臨床で治療を導入した症例の内NS5A-Y93の耐性変異の有無をInvader法の変異相対定量法にて測定したのは359例であり、男性150例、女性209例、年齢中央値は71歳であった。肝硬変症例が158例44%含まれていた。NS5A-Y93の変異相対定量法における変異の分布は、1%未満が282例80%、1-19%が13例3%、20-98%が10例3%、99%以上が4例1%であり、耐性の有無を検出不能の症例は50例14%であった。

治療開始後12週までのHCV RNA陰性化率をInvader法の変異相対定量により変異が1%未満、1-19%、20%以上の3群で分けて検討すると、それぞれ4週目は84%、75%、62%、8週目は99%、100%、88%と変異のある症例で陰性化時期が遅れる傾向にあったが、12週目では3群とも100%と同等であった。

D. 考察

Genotype 1b型、高ウイルス量のC型慢性肝炎に対するDCV+ASV併用療法は、国内第2/3相試験の結果より、Direct sequence法による薬剤耐性の検出は治療効果とよく相関することがわかった。一方、Invader assay法のNS3-D168定性法での弱陽性例は陰性例とほぼ同等の高い治療効果が得られており、耐性検出の有無で治療効果の予測は困難であると考えられる。またNS5A-L31定性における変異陽性例は、同時にNS5A-Y93の変異の有無が治療効果に影響する可能性があると思われるが、変異陽性例が少ないため、症例数が増えた段階で再評価を要するものとする。NS5A-Y93変異は、定性法でも変

異相対定量法でも治療効果とよく相関しており、治療効果予測に有用であると思われる。

また、実臨床におけるDCV+ASV併用療法では、Invader法の変異相対定量法で変異のある症例が7%含まれていた。治療開始後12週目までの早期のHCV RNA陰性化率は、Invader変異相対定量法での変異型比率が治療早期の陰性化率に関係する傾向があったが、最終治療効果との関係について、今後評価していく必要がある。一方で、Invader法により耐性の有無を検出不能であった症例も14%含まれていた。このInvader法で耐性を評価できない症例についてはdirect sequence法での再評価が望ましく、こういった症例についても今後最終治療効果との関連を評価する必要がある。

E. 結論

DCV/ASV併用療法において、治療開始前にInvader定性法で検出された耐性変異は、NS3-D168に関しては治療効果と相関がなかったが、NS5A-Y93については単独変異でも治療効果と相関した。今後は、Invader変異相対定量法による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。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akiyama S, Ikeda K, Sezaki H, Fukushima T, Sorin Y, Kawamura Y, Saitoh S, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Therapeutic effects of short- and intermediate-term tolvaptan administration for refractory ascites in patients with advanced liver cirrhosis.

- Hepatol Res. 2014 [Epub ahead of print]
- 2) Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. HLA-DP genes polymorphisms associate with hepatitis B surface antigen kinetics and seroclearance during nucleot(s)ide analogue therapy. *Liver Int.* 2014 [Epub ahead of print]
 - 3) Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Suzuki Y, Kumada H. Virologic breakthrough in a patient with chronic hepatitis B by combination treatment with tenofovir disoproxil fumarate and entecavir. *Drug Des Devel Ther.* 2014 [Epub ahead of print]
 - 4) Ikeda K, Kawamura Y, Kobayashi M, Fukushima T, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Prevention of disease progression with anti-inflammatory therapy in patients with HCV-related cirrhosis: a Markov model. *Oncology.* 2014;86(5-6):295-302.
 - 5) Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Evolution of simeprevir-resistant variants over time by ultra-deep sequencing in HCV genotype 1b. *J Med Virol.* 2014 Aug;86(8):1314-22.
 - 6) Sezaki H, Suzuki F, Hosaka T, Akuta N, Fukushima T, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Effectiveness and safety of reduced-dose telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res.* 2014 Oct;44(10):E163-71.
 - 7) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Utility of detection of telaprevir-resistant variants for prediction of efficacy of treatment of hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Clin Microbiol.* 2014 Jan;52(1):193-200.
 - 8) Arase Y, Kobayashi M, Kawamura Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Impact of virus clearance for the development of hemorrhagic stroke in chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2014 Jan;86(1):169-75.
 - 9) Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Hara T, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Correlation between hepatitis B virus surface antigen level and alpha-fetoprotein in patients free of hepatocellular carcinoma or severe hepatitis. *J Med Virol.* 2014 Jan;86(1):131-8.
 - 10) Kawamura Y, Ikeda K, Fukushima T, Hara T, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Potential of a no-touch pincer ablation procedure for small hepatocellular carcinoma that uses a multipolar radiofrequency ablation system: An experimental animal study. *Hepatol Res.* 2014 Nov;44(12):1234-40.
 - 11) Kawamura Y, Ikeda K, Fukushima T, Seko Y, Hara T, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. What Is the Most Effective Drug Delivery System for

Cisplatin during the Treatment of Hepatic Tumors with Single-Session Transcatheter Chemotherapy? A Pilot Study. Gut Liver. 2013 Sep;7(5):576-84.

- 12) Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H. Long-term efficacy and emergence of multidrug resistance in patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B treated by combination therapy with adefovir plus lamivudine. J Gastroenterol. 2014 Jun;49(6):1094-104.
- 13) Kobayashi M, Hosaka T, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H. Seroclearance rate of hepatitis B surface antigen in 2,112 patients with chronic hepatitis in Japan during long-term follow-up. J Gastroenterol. 2014 Mar;49(3):538-46.
- 14) Tanaka M, Suzuki F, Seko Y, Hara T, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Renal dysfunction and hypophosphatemia during long-term lamivudine plus adefovir dipivoxil therapy in patients with chronic hepatitis B. J Gastroenterol. 2014 Mar;49(3):470-80.

2.学会発表

- 1) 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光. C型慢性肝炎に対する DAAs 併用療法の治療効果、第 100 回日本消化器病学会総会、東京、2014.4.24.
- 2) 福島泰斗、池田健次、宋林祐史、川村祐介、小林正宏、齋藤聡、瀬崎ひとみ、

保坂哲也、芥田憲夫、鈴木文孝、鈴木義之、荒瀬康司、熊田博光. 肝動脈塞栓材 DC beed に対するエピルピシン含浸に関する検討、第 100 回日本消化器病学会総会、東京、2014.4.24.

- 3) 小林正宏、宋林祐史、福島泰斗、川村祐介、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、鈴木文孝、鈴木義之、齋藤聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光. AFP、FIB-4 index を用いた C 型肝疾患よりの発癌リスクの層別化、第 100 回日本消化器病学会総会、東京、2014.4.25.
- 4) 川村祐介、荒瀬康司、池田健次、宋林祐史、福島泰斗、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、小林正宏、齋藤聡、鈴木文孝、鈴木義之、熊田博光. 病勢進行型 NASH の予測に有用な因子の検討、第 100 回日本消化器病学会総会、東京、2014.4.26.
- 5) 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、宋林祐史、田中崇、福島泰斗、川村祐介、保坂哲也、芥田憲夫、小林正宏、鈴木義之、齋藤聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光. C 型慢性肝炎に対するシメプレビルおよびテラプレビル併用療法の効果と安全性の比較、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.5.29.
- 6) 川村祐介、池田健次、宋林祐史、福島泰斗、保坂哲也、小林正宏、齋藤聡、瀬崎ひとみ、芥田憲夫、鈴木文孝、鈴木義之、荒瀬康司、熊田博光. 経皮的ラジオ波焼灼療法における局所制御向上のための標的肝癌結節の選別、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.5.29.
- 7) 齋藤聡、川村祐介、井上雅文、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、小林正宏、鈴木文孝、鈴木義之、荒瀬康司、池田健次、熊田博光. 超音波および MRI 検査による 4 種類の肝脂肪定量法の比較検討、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.5.29.
- 8) 小林万利子、鈴木文孝、芥田憲夫、鈴

- 木義之、保坂哲也、瀬崎ひとみ、川村祐介、小林正宏、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光.感染経路別にみた長期観察 B 型慢性肝疾患の HBs 抗原量の変化と予後、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.5.29.
- 9) 小林正宏、鈴木文孝、福島泰斗、川村祐介、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、鈴木義之、斎藤聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光.経口 DAA 製剤による SVR 達成とその後の発癌抑制効果に関する検討、第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014.5.30.
- 10) 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光.線維化マーカーからみた C 型慢性肝疾患に対する DAAs 併用療法の治療効果、第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014.10.23.
- 11) 福島泰斗、池田健次、宋林祐史、川村祐介、小林正宏、斎藤聡、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、鈴木文孝、鈴木義之、荒瀬康司、熊田博光.肝細胞癌に対する DEB-TACE の初期使用経験、第 18 回日本肝臓学会大会、神戸、2014.10.23.
- 12) 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、熊田博光.ダクタスビル+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、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、2014.11.27.
- 13) 宋林祐史、池田健次、川村祐介、國本英雄、福島泰斗、小林正宏、斎藤聡、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、鈴木文孝、鈴木義之、荒瀬康司、熊田博光.当院におけるアルコール性肝硬変の発癌とその予後、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、2014.11.27.
- 14) 國本英雄、池田健次、宋林祐史、福島泰斗、川村祐介、小林正宏、斎藤聡、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、鈴木文孝、鈴木義之、荒瀬康司、熊田博光.C 型肝炎 SVR 後の肝癌発癌例における治療後再発と長期予後、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、2014.11.27.
- 15) 福島泰斗、池田健次、宋林祐史、川村祐介、小林正宏、斎藤聡、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、鈴木文孝、鈴木義之、荒瀬康司、熊田博光.マイクロスフィア使用 TACE 施行後の腫瘍マーカー推移についての検討、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、2014.11.28.
- 16) 藤野初江、鈴木文孝、宋林祐史、福島泰斗、國本英雄、藤山俊一郎、川村祐介、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、小林正宏、斎藤聡、鈴木義之、池田健次、荒瀬康司、熊田博光.当院における genotype A 型 B 型慢性肝疾患の臨床像と治療成績、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、2014.11.28.
- 17) 藤山俊一郎、斎藤聡、鈴木義之、宋林祐史、福島泰斗、國本英雄、藤野初江、川村祐介、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、小林正宏、鈴木文孝、荒瀬康司、池田健次、熊田博光.肝硬変合併門脈血栓に対する Danaparoid Sodium による治療の検討、第 40 回日本肝臓学会東部会、東京、2014.11.28.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。