

委託業務成果報告書表紙

厚生労働科学研究委託費

肝炎等克服実用化研究事業

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

委託業務成果報告書目次

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 . 長野県におけるC型肝炎ウイルスの遺伝子変異についてに関する研究 -----	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 . 次世代シーケンズ技術を用いたDAA耐性変異HCVの検出に関する研究 -----	13
前川伸哉	
4 . DCV/ASV無効例・中止再燃例におけるウイルス遺伝子変異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 . 薬剤耐性ウイルスの存在比率と治療効果に関する研究 -----	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 . 学会等発表実績 -----	
IV . 研究成果の刊行物・別刷 -----	31

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

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係る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 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(Asunaplevir;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)

新規測定系の確立

Invader 法 NS5A aaY93H 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, NS5A-aaL31M, aaY93H で作成した。

Invader 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 aaY93H (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-aaY93H 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-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(ポリマーゼ阻害剤を含む)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と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 NS5AY93H 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 例認められたが、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 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。

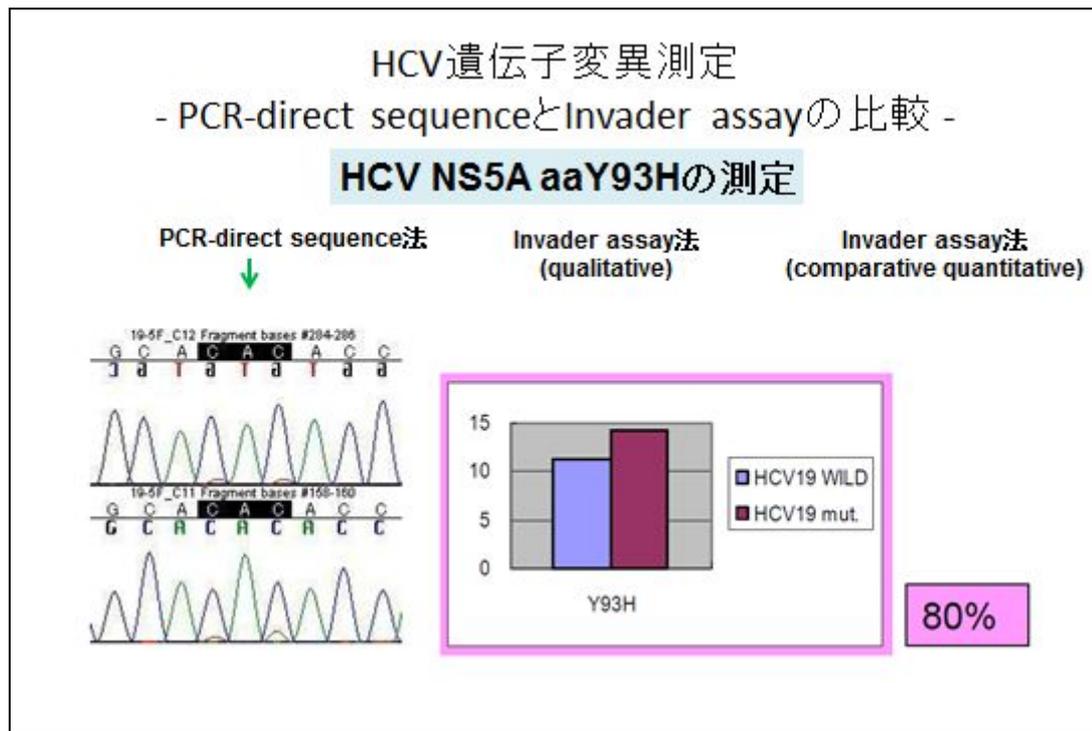
2. 実用新案登録

今回の研究内容については特になし。

3.その他

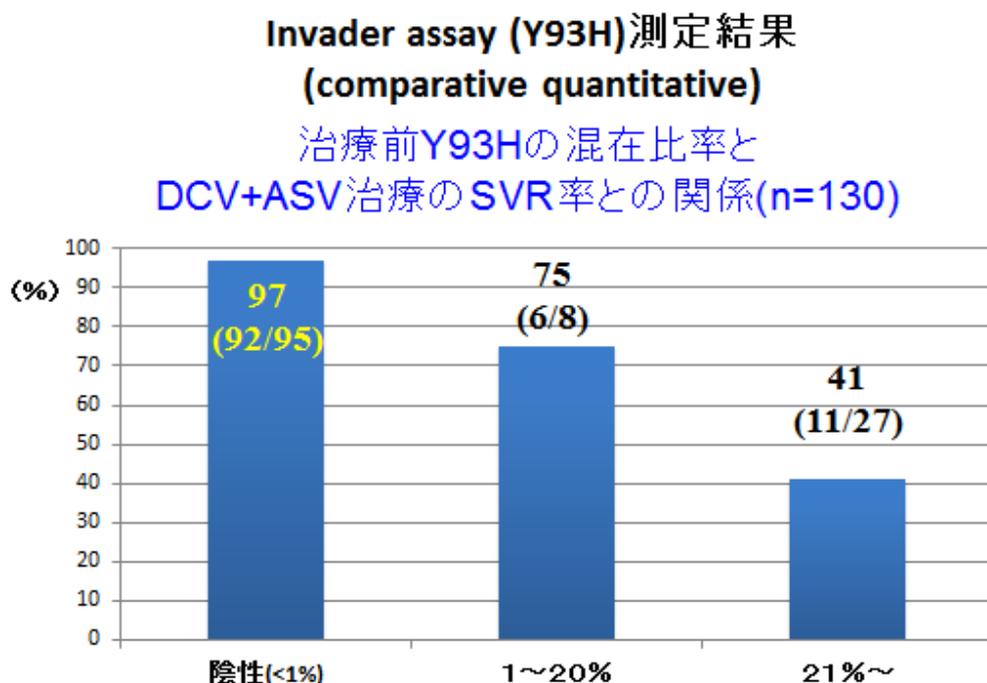
今回の研究内容については特になし。

図1. インターフェロンフリーの新規内服治療(ダクラタスビル+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. ダクラタスビル+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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kumada H, Sato K, Takehara T, Nakamura M, Ishigami M, Chayama K, Toyota J, <u>Suzuki F</u> , Nakayashu Y, Ochi M, Yamada I, Okanoue T	Efficacy of telaprevir-based therapy for difficult-to-treat patients with genotype 2 chronic hepatitis C in Japan.	Hpatol Res		Epub ahead of print.	2014
<u>Suzuki F</u> , 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.	J Gastroenterol	49	1094-1104	2014
Hara T, <u>Suzuki F</u> , Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Kumada H	Long-term entecavir therapy results in falls in serum hepatitis B surface antigen levels and seroclearance in nucleos(t)ide-naive chronic hepatitis B patients.	J Viral Hepat	21	802-808	2014
<u>Suzuki F</u> , 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	8	869-873	2014
Ikeda K, Kawamura Y, Kobayashi M, Fukushima T, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Saitoh S, <u>Suzuki F</u> , Suzuki Y, Arase Y, Kumada H	Prevention of disease progression with anti-inflammatory therapy in patients with HCV-related cirrhosis: A Markov model.	Oncology	86	295-302	2014
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, 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	86	1314-1322	2014

Akuta N, <u>Suzuki F</u> , 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.	JCM	52	193-200	2014
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Kobayashi M, Hara T, Sezaki H, 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	86	131-138	2014
Arase Y, Kobayashi M, Kawamura Y, <u>Suzuki F</u> , Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saitoh 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	86	169-175	2014
Tanaka M, <u>Suzuki F</u> , 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	49	470-480	2014
Kobayashi M, Hosaka T, <u>Suzuki F</u> , 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	49	538-546	2014
Kawakami Y, <u>Suzuki F</u> , Karino Y, Toyota J, Kumada H, Chayama K	Telaprevir is effective given every 12 h at 750mg with pegylated interferon- α 2b and ribavirin to Japanese patients with HCV-1b IL28B rs8099917 TT.	Antiviral Therapy	19	277-285	2014
Hosaka T, <u>Suzuki F</u> , 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 nucleo(s)ide analogue therapy.	Liver Int		Epub ahead of print	2014

Kawamura Y, Ikeda K, Fukushima T, Hara T, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Sezaki H, Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Suzuki Y, Kumada H	Potential of a no-touch pincer ablation procedure for small hepatocellular carcinoma that uses amultipolar radiofrequency ablation system: An experimental animal study.	Hepato Res		Epub ahead of print	2014
Sezaki H, <u>Suzuki F</u> , 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.	Hepato Res	44	163-171	2014
<u>Suzuki F</u> , Toyota J, Ikeda K, Chayama K, Mochida S, Hayashi N, Ishikawa H, Miyagoshi H, Wenhua Hu, Fiona McPhee, Eric A Hughes, Kumada H	A randomized trial of daclatasvir with peginterferon alfa-2b and ribavirin for HCV genotype 1 infection.	Antiviral Therapy	19	491-499	2014

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：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 小松 通治 信州大学医学部内科学第二教室 助教
研究協力者 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

分担研究課題：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

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ている。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Asnarevir(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Asnarevir(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

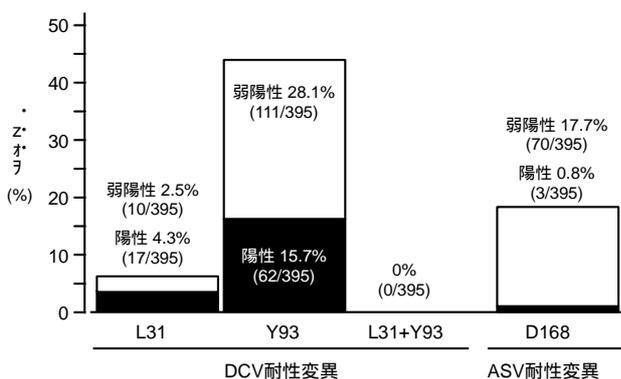


図 治療開始前にみられた経口DS2剤関連耐性変異

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。

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

HCV 感染末期腎不全患者における DCV/ASV 耐性変異の検討

研究分担者 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。

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） 分担研究報告書

研究テーマ名 次世代シーケンス技術を用いた DAA 耐性変異 HCV の検出

研究分担者 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懸念されている。

HCV は遺伝子変異を高頻度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な申請を行い、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、breakthrough 1 例、再燃 2 例、NVR 2 例であった。non-SVR 8 例中 5 例 (62.5%) で明確な耐性変異を有したと考えられた。2 例で治療前に耐性

に關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ようになった。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

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。

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 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。

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 DCV/ASV 療法の薬剤耐性からみた HCV dynamics

研究分担者 狩野吉康 札幌厚生病院 肝臓内科 副院長

研究要旨：Daclatasvir/Asunaprevir 併用療法時の抗ウイルス効果を Direct sequence (DS) 法 PCR-Invader (PI) 法 (BML) の二法で比較した。DAA 未治療の 49 例 (DSV/ASV 治験参加例) と 194 例 (非治験例) では PI 法で薬剤耐性変異を測定、治験例のうちの 35 例では DS 法で薬剤耐性変異を測定した。DS 法での薬剤耐性は D168 1 例 (3.0%)、L31 0 例 (0%)、Y93 6 例 (18.2%)、PI 法では D168 陽性 9 例 (4.6%)、弱陽性 94 例 (48.5%)、L31 陽性 6 例 (3.1%)、弱陽性 8 例 (4.1%)、Y93 陽性 44 例 (22.7%)、弱陽性 65 例 (33.5%) であった。DCV/ASV 治療例の薬剤耐性の有無別の SVR 達成率は DS 法では D168 耐性変異 有：100% (N=1)、無：91.2% (N=34)、Y93 耐性変異 有：71.4% (N=7)、無：95.6% (N=23)、PI 法では D168 耐性変異 弱陽性：88.9% (N=9)、無：95.8% (N=24)、Y93 耐性変異 陽性：66.7% (N=6)、弱陽性：100% (N=7)、無 95.2% (N=21) であり、いずれの測定法でも薬剤耐性変異の無い症例では高率に SVR が得られていた。PI 法での弱陽性の治療効果に対する関与は少ないものと思われた。実臨床例で D168, L31, Y93 の弱陽性有無別の HCV dynamics 検討を行ったが、弱陽性の有無、弱陽性の数とともに dynamics に対する影響を認めなかった。以上より弱陽性と判定される薬剤耐性の DCV/ASV 治療効果に対する影響は軽微と考えられた。

A. 研究目的

今後の C 型肝炎治療は DAA 併用療法が主役になって行くと思われるが、DAA による治療の最も大きな障害は薬剤耐性ウイルスの存在である。すなわち治療に用いる DAA に対する耐性 HCV が存在すると治療効果が減弱することになる。現状では薬剤耐性 HCV に対する検査系の評価は定まっておらず、また検査の結果がどの程度治療効果を左右するのかも明らかになっていない。そのため、二つの検査系、Direct sequence (DI) 法、PCR-Invader (PI) 法を用いて Daclatasvir/Asunaprevir 併用療法の効果とベースラインの耐性ウイルスの関連を検討した。

B. 研究方法

DAA 未治療の 49 例 (DSV/ASV 治験参加例) と 194 例 (非治験例) を対象とした。治験例は DCV/ASV の第 2 相および第 3 相試験参加者で、すでに最終的な治療効果 (SVR/非 SVR) が確定している症例である。非治験例は、DCV/ASV 治療導入を念頭に HCV 薬剤耐性変異を測定した症例である。治験参加例においては、二つの測定法別に薬剤耐性の有無別に治療効果との関連を検討した。検討した耐性部位は NS3 領域の D168、NS5A 領域の L31 と Y93 である。

PI 法では変異ウイルスのみ、或いは変異ウイルスと野生型ウイルスが混在して検出された症例を薬剤耐性有り、野生型ウイルスのみの症例を薬剤耐性無しと判定した。PI 法では NS3、NS5A 領域のアミノ酸変異を定性的に解析し、変異型の存在比率から 20%以上を陽性、20%未満を弱陽性と陰性に判定した。

治験症例では D168, L31, Y93 の耐性変異の存在

と DCV/ASV 併用療法の効果の関連を二つの測定法で検討した。非治験例では二つの測定法での各々部位の耐性変異の頻度を検討した。また DSV/ASV 併用療法導入例を対象として、PI 法にて弱陽性と判定された症例での HCV dynamics を検討した。

(倫理面への配慮)

治験参加例においては、治験参加の同意を得ている。また全ての症例において画像診断を含む検査データのデータベースへの登録、血清の保存、およびそれらのデータの医学研究への使用の同意を得ている。

個人情報の管理に当たっては使用する PC、データベースにパスワードを設定し、情報の流失をブロックしている。

C. 研究結果

研究成果は、薬剤耐性ウイルスの測定が可能になった今年度の成果である。

DS 法および PI 法による DAA 未使用例の NS3、NS5A 薬剤耐性変異の存在比率

DS 法での薬剤耐性は D168 1 例 (3.0%)、L31 0 例 (0%)、Y93 6 例 (18.2%)、PI 法では D168 陽性 9 例 (4.6%)、弱陽性 94 例 (48.5%)、L31 陽性 6 例 (3.1%)、弱陽性 8 例 (4.1%)、Y93 陽性 44 例 (22.7%)、弱陽性 65 例 (33.5%) であった。PI 法の陽性例で薬剤耐性のみで比較しても PI 法で耐性ウイルスの存在が高率であった。(図 1)

薬剤耐性の有無と治療効果 (SVR/非 SVR)

1) DS 法による薬剤耐性変異と治療効果

DS 法では L31 の耐性変異例は認めなかった。耐性変異の有無別の SVR 率は D168 変異有り

100%(N=1)、無し 91.2%(N=34)であった。Y93H 変異有り 71.4%(N=7)、無し 95.6%(N=23)であった。D168 耐性変異なしで非 SVR となった 2 例はいずれも Y93H を有していた。(図 2)

PI 法では SVR 率は D168 耐性変異 弱陽性：88.9%(N=9)、無：95.8%(N=24)、Y93 耐性変異 陽性：66.7%(N=6)、弱陽性：100%(N=7)、無 95.2%(N=21)であった。(図 3)いずれの測定法においても薬剤耐性変異の無い症例では高率に SVR が得られていた。PI 法での弱陽性例においても高率に SVR が得られており、今回の治験全体の SVR 率を上回っていた。

PI 法弱陽性例の HCV dynamics

PI 法弱陽性の臨床的意義を検討する目的で当院の治験参加例を対象に、D168, L31, Y93 の弱陽性数(0, 1, 2, 3)と Y93H 耐性変異陽性に分け、HCV dynamics、HCV RNA 陰性化時期への影響を検討した。治験では治療開始 2 週目までに HCV RNA の陰性化した症例では、全例が SVR となったため治療 2 週間目の陰性化率で比較を行った。図 4 に弱陽性数別の HCV RNA の減衰(平均値)と陰性化率を示す。HCV RNA の減衰に差を認めず、治療 2 週間目の HCV RNA の陰性化率にも弱陽性の有無、さらに弱陽性数にも一定の傾向を認めなかった。

D. 考察

2 種類の薬剤耐性変異測定系を比較検討したが、PI 法でやや薬剤耐性が高率に検出された。薬剤耐性変異と DCV/ASV 療法の SVR 率の検討では D168, L31 耐性例は少数であり検討が出来なかったが、Y93 変異の検討では DS 法、PI 法共に同様の傾向を示した。PI 法では弱陽性と判定されるグレーゾーンの症例が存在するが、これらの症例の SVR 率は治験全体の SVR 率と差が無く、HCV dynamics で見ても薬剤耐性ウイルスを持たない症例と差が無く、PI 法での弱陽性の臨床的な意義はごく軽微と考えられた。

E. 結論

DS 法、PI 法ともに Y93H の耐性変異検出例では DCV/ASV 併用療法の治療効果は大きく減弱し、これらの方法による耐性変異の検出は、DCV/ASV 併用療法の導入の可否の決定に有用である。PI 法で検出される弱陽性の臨床的な意義は少ないと思われる。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 狩野吉康、豊田成司. 抗ウイルス療法の副作用と対策 .C 型肝炎治療-DAA s で広がる治療対象 - 医療ジャーナル社 2014 年 133-147

2) 狩野吉康 . Daclatasvir(NS5A) +

Asunaprevir(PI)併用療法時の薬剤耐性変異の影響と対策 . 肝胆膵 2013 年 67 巻 935-942

3) Karino Y, Toyota J, Ikeda K, Suzuki F, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hernandez D, Yu F, McPhee F, Kumada H. Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. J Hepatol. 2013 Apr;58(4):646-54.

2. 学会発表

1) 山口将功, 小関至, 豊川揚也, 木村睦海, 荒川智宏, 中島知明, 桑田靖昭, 佐藤隆啓, 大村卓味, 髭修平, 狩野吉康, 豊田成司. daclatasvir/asunaprevir 併用療法非著効例に対して simeprevir を用いた 3 剤併用療法を行った 2 例の検討 . 日本肝臓学会東部会. 2014 年東京

2) Yoshiyasu Karino, Shuhei Hige, Tomoaki Nakajima, Mutsumi Kimura, Tomohiro Arakawa, Yasuaki Kuwata, Takahiro Sato, Takumi Ohmura, Joji Toyota . Analysis of the liver function and hepatic reserve improvement effect, and liver carcinogenesis suppressant effect of the Daclatasvir/Asunaprevir combination therapy . 2014AASLD, Boston

3) Yoshiyasu Karino, Itaru Ozeki, Shuhei Hige . Analysis of the liver function and hepatic reserve improvement effect, and liver carcinogenesis restraint effect of the Daclatasvir Plus Asunaprevir combination therapy. 2014 年日本肝臓学会大会 . 神戸

4) Karino Y, Chayama K, Suzuki Y, Ikeda K, Toyota J, Kawakami Y, Ido A, Yamamoto K, Takaguchi K, Miyagoshi H, Eley T, McPhee F, Hu W, Ishikawa H, Hughes EA, Kumada H. On Treatment Predictors of Response to Daclatasvir (DCV) in Combination With Asunaprevir (ASV) in Japanese Patients With Genotype 1b Infection. 2014 APASL, Brisbane

(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：無し

2. 実用新案登録：無し

3. その他：無し

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。

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.ダクラタスビル+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。

別紙4
書籍

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木 文孝	NS5A阻害剤	榎本 信幸	HEPATOLOGY PRACTICE V ol.3	文光堂	東京	2014	189-192
鈴木 文孝	C型慢性肝炎治療 のガイドライン(厚労省 研究班編)の概説	熊田 博光	C型肝炎治療 ～DAA s で広 がる治療対 象～	(株)医薬 ジャーナル 社	東京	2014	55-62
鈴木 文孝	DAA sによるIFNフリー 療法(IFN free regi men)	熊田 博光	C型肝炎治療 ～DAA s で広 がる治療対 象～	(株)医薬 ジャーナル 社	東京	2014	108-119
馬渡 誠一、宇都 浩文、井戸 章 雄	HCVのウイルス学 的特徴	熊田博光、 茶山一彰、 豊田成司	C型肝炎治療	医薬ジャ ーナル	東京	2014	22-31
荒井 邦明、 金子 周一	肝臓病学 C型肝炎治療の転 換期		臨床医学の 展望2014	日本医事 新報	東京	2014	2-9

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki F, Toyota J, Ikeda K, Chayama K, Mochida S, Hayashi N, Ishikawa H, Miyagoshi H, Wenhua Hu, Fiona McPhee, Eric A Hughes, Kumada H	A randomized trial of daclatasvir with peginterferon alfa-2b and ribavirin for HCV genotype 1 infection.	Antiviral Therapy	19	491-499	2014
Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M,	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.	J Gastroenterol	49	1094-1104	2014

Watahiki S, Mineta R, Kumada H					
Hara T, <u>Suzuki F</u> , Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Kumada H	Long-term entecavir therapy results in falls in serum hepatitis B surface antigen levels and seroclearance in nucleos(t)ide-naive chronic hepatitis B patients.	J Viral Hepat	21	802-808	2014
<u>Suzuki F</u> , Akuta N, Suzuki Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, I keda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, S uzuki Y, Kumada H	Virologic breakthrough in a patient with chronic hepatitis B by combination treatment with tenofovir disoproxil fumarate and entecavir.	Drug Des Devel	8	869-873	2014
Ikeda K, Kawamura Y, Kobayashi M, Fukushima T, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Saitoh S, <u>Suzuki F</u> , Suzuki Y, Arase Y, Kumada H	Prevention of disease progression with anti-inflammatory therapy in patients with HCV-related cirrhosis: A Markov model.	Oncology	86	295-302	2014
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, 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	86	1314-1322	2014
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , 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.	JCM	52	193-200	2014
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Kobayashi M, Hara T, Sezaki H, 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	86	131-138	2014
Arase Y, Kobayashi M, Kawamura Y, <u>Suzuki F</u> , Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saitoh 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	86	169-175	2014

Tanaka M, <u>Suzuki F</u> , 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	49	470-480	2014
Kobayashi M, Hosaka T, <u>Suzuki F</u> , 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	49	538-546	2014
Kawakami Y, <u>Suzuki F</u> , Karino Y, Toyota J, Kumada H, Chayama K	Telaprevir is effective given every 12 h at 750mg with pegylated interferon- α 2b and ribavirin to Japanese patients with HCV-1b IL28B rs8099917 TT.	Antiviral Therapy	19	277-285	2014
Hosaka T, <u>Suzuki F</u> , 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 nucleoside analogue therapy.	Liver Int		Epub ahead of print	2014
Kawamura Y, Ikeda K, Fukushima T, Hara T, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Sezaki H, Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Suzuki 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		Epub ahead of print	2014
Sezaki H, <u>Suzuki F</u> , 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	44	163-171	2014
Kumada H, Sato K, Takehara T, Nakamura M, Ishigami M, Chayama K, Toyota J, <u>Suzuki F</u> , Nakayasu Y, Ochi M,	Efficacy of telaprevir-based therapy for difficult-to-treat patients with genotype 2 chronic hepatitis C in Japan.	Hepatol Res		Epub ahead of print.	2014

Yamada I, Okanoué T					
<u>Karino Y</u> , Toyota J, Ikeda K, Suzuki F, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hernandez D, Yu F, McPhee F, Kumada H.	Telaprevir impairs renal function and increase blood ribavirin concentration during telaprevir/pegylated interferon/ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	J Hepatol	21	341-347	2014
Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, <u>Maekawa S</u> , Enomoto N, Okamoto T, Matsura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K.	Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus.	J Virol.	88(22)	13352-66.	2014
Tatsumi A, <u>Maekawa S</u> , 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.		Epub ahead of print	2014
Miura M, <u>Maekawa S</u> , 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.		Epub ahead of print	2014
Komatsu N, Motosugi U, <u>Maekawa S</u> , 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 gadoteric acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging.	Hepatol Res.	44(13)	1339-1346.	2014
<u>Maekawa S</u> , 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.	49(1)	163-4.	2014
Oda K, <u>Uto H</u> , 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.	86	1877-1885	2014

Tokunaga M, <u>Uto H</u> , Oda K, Tokunaga M, M awatari S, Kumagai K, Haraguchi K, Oketani M, Ido A, Ohnou N, Ut sunomiya A, Tsubouchi H	Influence of human T-lymphotro pic virus type 1 coinfection on t he development of hepatocellular carcinoma in patients with hepa titis C virus infection	J Gastroenterol	49	1567-1577	2014
Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, Akuta N, <u>Sezaki H</u> , 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.	J Gastroenterol	49	1094-1104	2014
Hara T, Suzuki F, Kawamura Y, <u>Sezaki H</u> , Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Kumada H	Long-term entecavir therapy results in falls in serum hepatitis B surface antigen levels and seroclearance in nucleos(t)ide-naive chronic hepatitis B patients.	J Viral Hepat	21	802-808	2014
Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, <u>Sezaki H</u> , 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	8	869-873	2014
Ikeda K, Kawamura Y, Kobayashi M, Fukushima T, <u>Sezaki H</u> , 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	86	295-302	2014
Akuta N, Suzuki F, <u>Sezaki H</u> , Suzuki Y, Hosaka T, 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	86	1314-1322	2014
Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, <u>Sezaki H</u> , 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.	JCM	52	193-200	2014

Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Hara T, <u>Sezaki H</u> , 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	86	131-138	2014
Arase Y, Kobayashi M, Kawamura Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, <u>Sezaki H</u> , Saitoh 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	86	169-175	2014
Tanaka M, Suzuki F, Seko Y, Hara T, Kawamura Y, <u>Sezaki H</u> , 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	49	470-480	2014
Kobayashi M, Hosaka T, Suzuki F, Akuta N, <u>Sezaki H</u> , 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	49	538-546	2014
Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Fukushima T, Kawamura Y, <u>Sezaki H</u> , 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 nucleoside analogue therapy.	Liver Int		Epub ahead of print	2014
Kawamura Y, Ikeda K, Fukushima T, Hara T, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, <u>Sezaki H</u> , Akuta N, Suzuki F, Suzuki 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		Epub ahead of print	2014
<u>Sezaki H</u> , 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	44	163-171	2014

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, <u>Arai K</u> , 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.	46	3523-3535	2014
Terashima T, Yamashita T, <u>Arai K</u> , 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.	44	1179-1185	2014
Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, <u>Arai K</u> , 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.		Epub ahead of print	2015
Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, <u>Arai K</u> , 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.	35	582-590	2015
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, <u>Arai K</u> , Miyake Y, Abe M, Taniai M, Saibara T, Sakisaka S, Takikawa H, Onji M, Tsubouchi H,	Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis.	Hepatol Res.		Epub ahead of print	2015

Nakanuma Y, Ishibashi H.					
Ooka Y, Chiba T, Ogasawara S, <u>Arai K</u> , 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.	32	723-728	2014
Terashima T, Mizukoshi E, <u>Arai K</u> , Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, Honda M, Kaneko S.	P53, hTERT, WT-1, and VEGF R2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic ad enocarcinoma.	Cancer Immunol Immunother.		Epub ahead of print	2015
Takeshita Y, Takamura T, Honda M, Kita Y, Zen Y, Kato K, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, <u>Arai K</u> , Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S.	The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial.	Diabetologia.	57	878-890	2014
Honda M, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, <u>Arai K</u> , Yamas hita T, Sakai Y, Yamas hita 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.	59	828-838	2014
Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, <u>Hiraga N</u> , 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 c hronic hepatitis C virus genotype 1 infection in patients treated with Daclatasvir, Peginterferon, a nd Ribavirin.	AAC	58	2105-2112	2014