

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790471
 研究課題名（和文） オーダーメイド治療を視野に入れた、B型肝炎抗ウイルス療法の基礎的検討
 研究課題名（英文） Basic investigation of Hepatitis B antiviral therapy that contemplates custom made treatment
 研究代表者
 五藤 忠（GOTO TADASHI）
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号 40444088

研究成果の概要：

ラミブジン耐性株の quasispecies を検討した。TaqMan MGB probe assay により、YVDD 変異に関しては 2.0 log コピー中に 10% (= 10 log コピー) の存在、YIDD 変異に関しては 2.7 log コピー中に 10% (= 50 log コピー) の存在の検出が可能となった。また HBV DNA が 2.6 log コピー（最近までの検出限界量）未満の臨床検体でも変異株を検出でき、感度は従来の Direct Sequencing 法、INNO LiPA 法を上回った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓病学，B型肝炎ウイルス，抗ウイルス療法，薬剤耐性，TaqMan PCR

1. 研究開始当初の背景

効果的なワクチンが開発され、新規キャリアは激減したが、わが国にはなお 120-140 万人の B 型肝炎ウイルス (HBV) キャリアが存在する。肝細胞癌による死亡は年間 3 万人を超えるが、その約 20% に HBV 感染が関与している。さらに HBV は劇症肝炎の原因としても重要な位置を占め、また慢性肝炎からの急性増悪、肝硬変と合わせると、生命予後に関わる肝疾患の主要な原因といえる。

近年各種逆転写酵素阻害剤が使用可能となったが、耐性ウイルスの問題、長期の安全性が不明であり、慢性 HBV 感染に対して満足すべき抗ウイルス療法は確立されていない。HBV はその薬剤耐性において、原因となる遺伝子領域がわかっているため、対策が立てられる余地がある。

また最近抗がん剤を初めとして、各種薬剤の効果と副作用の観点から、個人レベルでの薬剤選択、すなわちオーダーメイド医療の

ニーズが高まってきている。

2000年11月、B型肝炎に対して初めて本邦で認可された経口抗ウイルス薬、ラミブジンは、その非常に強力な抗ウイルス作用により、慢性B型肝炎感染者に大きな恩恵をもたらした。しかし先行する海外での使用成績から、当初より耐性ウイルス発生による肝炎の急性増悪、劇症化が問題となっていた。

我々はラミブジン耐性ウイルスの出現機構を、ウイルス変異が複製・HBs抗原分泌機構の両面に与える影響から検討、報告した(Hepatology 1999)。またその際に野生型、ラミブジン耐性型(変異型)HBVに対する薬剤の効果を簡便に*in vitro*スクリーニングできる系を確立、この系を用い各種逆転写酵素阻害剤の、ラミブジン耐性ウイルスに対する抗ウイルス療法を提唱してきた(J.Clin. Invest. 1999, J.Clin. Invest. 2001)。その結果はこれら薬剤の実際の臨床効果と良く合致し、我々の確立した*in vitro*スクリーニング法が臨床効果をよく反映していることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

今回この仕事をさらに展開し、個々人に感染しているB型肝炎ウイルス依存性の薬剤選択を確立するため、

(1)実際に患者より得られたHBVの多数検体から、短時間で効率よくクローニングするsystemを確立すること、

(2)スクリーニング法を用いて各種薬剤を単独、または併用して抗ウイルス効果を検証し、臨床への反映を目指すこと、を当初の目的とした。

しかし研究を進める過程で、患者血清中には、ゲノムが少しずつ異なる複数のHBV株が存在すること(=quasispecies)が課題となった。少数の薬剤耐性株は、抗ウイルス薬投与前からすでに少量存在している可能性、また途中から変異で生じる可能性がある。すでに存在している場合には、使用できる薬剤に限りがある今日、慎重に抗ウイルス薬を選択しなければ長期でのウイルス制御は困難となる。また抗ウイルス薬投与中に出現した場合は、重篤な肝障害が生じうるため、早期に

発見することが望ましい。現在コマーシャルベースの検討では高ウイルス量且つ20-30%の変異株の存在がないと検出不能とされる。そこでまず、

(3)dominant株の中からよりminorな株の検出感度を上げることの検討を最初に行なうこととした。

3. 研究の方法

(1)患者血中B型肝炎ウイルスDNAの増幅およびクローニング、データベース化:

われわれはすでにlong PCRを応用して、患者血液(血清)から抽出したB型肝炎ウイルスDNAを鋳型として、3.2 kbの全長ウイルスDNAのone stepでの増幅に成功している(Hepatology 1999, J.Clin. Invest. 2001)。多数の臨床検体から、同様の方法にて全長ウイルスDNAのクローニングを行なう。その耐性プロファイルにそって、データベースを立ち上げる。

(3)少量の変異株の検出:

TaqMan-MGB probe assayを導入した。

以前報告した(Hepatology 1999)、野生型-YMDD-,ラミブジン耐性型(変異型)YIDD, YVDD-の計3種のplasmidを用いて、混在させた際の最小の検出感度を検討した。

ラミブジン使用中、ウイルスが増加した(耐性株が出現したと考えられる)症例において、TaqMan-MGB probe assayでウイルス変異株の検出を試みた。その際に従来のある方法である、Direct Sequencing法、INNO-LiPA法と比較した。

TaqMan-MGB probe assayに使用したprimerとTaqMan-MGB probeは以下のとおりである: Forward primer, 5'-GGGCTTCCCCACTGTT-3'; reverse primer, 5'-GTACAGACTTGGCCCCAATAC-3'; YMDD probe, 5'-FAM-CTTTCAGTTATATGATGATG-MGB-3'; YVDD probe, 5'-VIC-CTTTCAGTTATGTTGATGAT-MGB-3'; and YIDD probe, 5'-VIC-CTTTCAGTTATATTGATGATGTG-MGB-3'。また、Direct Sequencingに使用したprimerは以下のとおりである:

Sense primer, 5'-TGGGCCTCAGTCCGTTTCTC-3' (HBV nucleotides [nt] 647-666); antisense primer, 5'-GGACTCAAGATGTTGTACAG-3' (HBV nt 786-767)。

4. 研究成果

(1)患者血清は抗ウイルス薬投与前・投与中のものを含め、80検体以上保存した。その一部の血清から得られた臨床現場でのHBVをクローニングし、耐性株のデータの収集を行なった。

sequence 確認の過程で、患者血液中において、ゲノムが少しずつ異なる複数のHBV株の存在が確認された。実際臨床において、少数の薬剤耐性株が多数を占める感受性株（すなわち野生株）に「マスク」され、抗ウイルス薬の使用 感受性株の減少 薬剤耐性株の顕在化、が報告されている。

よって、当初予定の(2)スクリーニング法を用いて各種薬剤を単独、または併用して抗ウイルス効果を検証すること、の前に、(3)dominant株の中からより minorな株の検出感度を上げることの検討を最初に行なうこととした。

(3)問題となっているラミブジン耐性、いわゆる YMDD 変異に関して、短時間で混在した少量の変異株を検出できる系の確立を求めて TaqMan-MGB probe assay を導入した。

最初に野生型-YMDD-, ラミブジン耐性型(変異型)2種-YIDD, YVDD-の計3種の plasmid を単独で 8.0 log コピー~2.0 log コピーまで希釈して検討、TaqMan-MGB probe assay 系に問題がないこと、特異的にそれぞれ野生型、変異型を detect できることを確認した。

次に、野生型と変異型を混在させて、その検出限界の割合と、検出限界コピー数の検討を行なった。混合割合は 100:0, 90:10, 80:20, 50:50, 20:80, 10:90, or 0:100, で、また、総量は 8.0 log コピー~2.0 log コピーで検討した。TaqMan PCR にて、YVDD 変異株については総量 2log コピー、10%の割合まで検出できた。一方 YIDD 変異株については 10%の割合まで検出できたものの、総量 2.0 log コピーでは検出できず、2.7 log コピーが検出限界であった。すなわち YVDD 変異株については 1.0 log コピー(=10 log コピー)が、YIDD 変異株については 1.7 log コピー(=50 log コピー)が検出限界であった。一方、

Direct Sequencing 法では 5.0 log コピー中、20%の割合までが検出限界であった。

TaqMan-MGB probe assay 法の有用性を臨床検体で検討した。

抗ウイルス薬投与前・投与中 21 検体を用い、TaqMan-MGB probe assay 法と、Direct Sequencing 法、INNO-LiPA 法とを比較、検討した。TaqMan-MGB probe assay 法では、HBD DNA が、2.6log コピー(最近までのコマーシャルベースの検出限界量)未満の臨床検体でも、変異株を検出できた。また、それぞれの方法では 15 検体、11 検体、9 検体の変異株を検出でき、TaqMan-MGB probe assay 法でもっとも良好な結果が得られた。

今回の研究により、野生株の中で少量しか存在しない変異株を従来法よりも早期に検出できる可能性がわかった。このことは耐性ウイルス発生、ウイルス増加に伴う肝炎の急性増悪、劇症化を未然に防ぐことにつながる。また一方で、抗ウイルス薬投与前において、すでに存在している変異株を検出することにより、効率的で、無駄のない抗ウイルス薬投与ができることとなる。今後、さらに検出感度を上げる工夫によって、臨床的に重要な意味を持つ可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

加藤直也、五藤忠、小俣政男 核酸アナログ剤各論 これからの核酸アナログ 肝胆膵 査読無 2008; 56: 697-700

吉田晴彦、五藤忠、小俣政男 B 型肝炎の治療の現状と今後の動向 肝疾患 Review 査読無 2008; 139-144

五藤忠 B 型慢性肝炎 肝胆膵診療 エキスパートマニュアル 査読無 2008; 197-202

加藤直也、五藤忠、小俣政男 B 型慢性肝炎の抗ウイルス療法 抗ウイルス薬の将来 日本内科学会雑誌 査読無 2008; 97: 50-56

Hua R, Tanaka Y, Fukai K, Tada M, Seto M, Asaoka Y, Ohta M, Goto T, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using TaqMan minor groove binder probes. Clinica Chemica Acta 査読有 2008 ; 395 : 151 -154

五藤忠、加藤直也、小俣政男 新しい抗ウイルス剤の開発状況 コンセンサス肝疾患 2007 B型肝炎・C型肝炎の治療 査読無 2007 ; 73 -78

〔学会発表〕(計 2件)

T Goto, et al. Influence of serum HBV DNA level on a recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment with radio-frequency ablation. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2007/11/5 Boston, USA
五藤忠、他 経皮的ラジオ波焼灼療法による肝細胞癌根治的治療後の再発におけるHBV DNA量の影響 JDDW(第11回日本肝臓学会大会) 2007/10/19 神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

五藤 忠 (GOTO TADASHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 40444088