

抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向調査ならびに 薬剤耐性株検出系の外部精度管理に向けた実態調査

研究分担者 高下恵美

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究要旨

日本を含む東アジア地域における抗インフルエンザ薬耐性株の監視を目的として、日本、韓国、台湾、モンゴル、ミャンマーおよびラオスの分離株について、4 種類のノイラミニダーゼ（NA）阻害薬（オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビル）に対する感受性を調べた。その結果、日本国内において、オセルタミビル・ペラミビル耐性株が 10 株検出された。また、日本国内の耐性株サーベイランスにおいて、全国地方衛生研究所（地衛研）が実施している薬剤耐性株検出系について、検査精度の維持・向上を目的とした外部精度管理に向け、昨年度に続き、コア・サポート地衛研を対象とした実態調査を行った。その結果、コア・サポート地衛研における検査精度が昨年度より上昇していることが確認された。

A. 研究目的

日本国内において、インフルエンザの治療・予防には主に、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）蛋白質を標的とする NA 阻害薬のオセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルが使用されている。日本は世界最大級の抗インフルエンザ薬使用国であり、薬剤耐性株の出現リスクが高い。したがって耐性株の発生動向の把握は公衆衛生上極めて重要である。そこで、本研究では、薬剤耐性株の監視を目的として、日本を含む東アジア地域における NA 阻害薬耐性株の発生動向を調査した。

日本国内における耐性株サーベイランスは、国立感染症研究所（感染研）と全国地方衛生研究所（地衛研）が共同で実施している。地衛研では、平成 22 年度に導入された TaqMan RT-PCR 法により耐性株の検出を行っているが、検査精度の維持・向上を目的とした外部精度管理の開始に向けて、本研究では昨年度に続き、11 箇所のコア・サポート地衛研を対象とした実態調査を行った。

B. 研究方法

感染研において、日本、韓国、台湾、モンゴル、ミャンマーおよびラオスの分離株について、MUNANA 基質を用いた蛍光法または NA-XTD 基質を用いた化学発光法により、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を実施し、IC₅₀ 値を算出した。

さらに NA 遺伝子のシーケンス解析により、既知の薬剤耐性マーカーの有無を検索した。

11 箇所のコア・サポート地衛研では、平成 22 年度に感染研から配布された RNA 陽性コントロールを継続的に使用しており、RNA の経年劣化の可能性を否定できない。そこで、新たに RNA 陽性コントロールを合成し、11 箇所のコア・サポート地衛研に配布した。コア・サポート地衛研では、「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver. 2」に従って RNA 陽性コントロールの 10 倍階段希釈液を作製し、陰性コントロールと共に、TaqMan RT-PCR 法により検出した。

（倫理面への配慮）
該当なし

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 371 株および海外株 64 株、A(H3N2) ウイルスは国内株 268 株および海外株 131 株、B 型ウイルスは国内株 451 株および海外株 105 株について解析を行った。その結果、日本国内において、NA 蛋白質に H275Y 耐性変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスが 10 株検出された。A(H3N2) ウイルスおよび B 型ウイルスでは、国内外ともに耐性株は検出されなかった。国内株の解析結果は感染研ウェブサイト上で毎週公表し、自治体や医療機関に広く情報提供を行った。また、海外株の解析結果は、各国のナショナルインフルエンザセンターに対して

随時報告した。

外部精度管理に向けた実態調査では、評価項目を (1) H275 陽性コントロールおよび Y275 陽性コントロールを結んだ線が直線状になっているか。(2) 陰性コントロールが、両陽性コントロールの直線との交点付近にあるか。の 2 点とした。その結果、11 箇所すべてのコア・サポート地衛研において評価項目 (1) と (2) の両方を満たしていた。

D. 考察

オセルタミビル・ペラミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスが検出された 10 名の患者のうち 5 名は集団発生例であり、3 名は家族内発生例だった。いずれも耐性株の感染伝播が起こった可能性を否定できない。幸いなことに、その後耐性株の感染が広がった形跡は認められないが、今後の動向に注意が必要である。

昨年度のコア・サポート地衛研における薬剤耐性株検出系の実態調査では、2 箇所の地衛研で評価項目 (1) に問題があった。一方、今年度の実態調査では、11 箇所すべてのコア・サポート地衛研において評価項目 (1) と (2) の両方を満たしていた。

E. 結論

日本国内において検出されたオセルタミビル・ペラミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスについては、限局的な感染伝播が起こった可能性があり、今後も引き続き耐性株の監視を行う必要がある。

コア・サポート地衛研においては、薬剤耐性株検出系の検査精度が昨年度より上昇していることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015. *Influenza Other Respir Viruses*. 11(5) 399-4032017
- Gubareva LV, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Huang W, Hurt AC,

Jorquera PA, Lackenby A, Leang SK, Lo J, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Odagiri T, Wang D, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2015-2016. *Antiviral Res*. 146 12-20 2017

- Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from A Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe*. 22(5) 615-26 2017
- Yasuhara A, Yamayoshi S, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sakai-Tagawa Y, Uraki R, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Sasaki T, Ikuta K, Yamada S, Kawaoka Y. Diversity of antigenic mutants of influenza A(H1N1)pdm09 virus escaped from human monoclonal antibodies. *Sci Rep*. 7(1)177352017
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis*. (In press)

2. 学会発表

- ・ 高下恵美. 日本国内で検出されたオセ ルタミビル・ペラミビルに強い耐性を示すインフルエンザウイルス. 第 91 回 日本感染症学会、新宿、2017 年 4 月
- ・ 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、白 倉雅之、三浦秀佳、中村一哉、岸田典 子、桑原朋子、佐藤彩、秋元未来、渡 辺佳世、渡邊真治、小田切孝人. 日本 国内で検出された A(H1N1)pdm09 二重耐 性変異ウイルスの性状解析. 第 31 回 インフルエンザ研究者交流の会シンポ ジウム、静岡 2017 年 6 月
- ・ 桑原朋子、高下恵美、藤崎誠一郎、白 倉雅之、中村一哉、岸田典子、高橋仁、 秋元未来、小川理恵、三浦秀佳、佐藤 彩、菅原裕美、鈴木典子、渡邊真治、 小田切孝人. 鶏卵で継代培養した埼玉 株の NA に特徴的に認められたアミノ酸 置換. 第 31 回 インフルエンザ研究者 交流の会シンポジウム、静岡、2017 年 6 月
- ・ Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan. 5th ISIRV AVG conference, Shanghai, China, June 2017.
- ・ Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Yokoyama M, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. Growth capabilities of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir. 6th ESWI Influenza Conference, Riga, Latvia, Sep. 2017
- ・ Takashita E, Shirakura M, Fujisaki S, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Antiviral susceptibility of avian influenza A(H7N9) viruses isolated from humans. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大 阪、2017 年 10 月
- ・ Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2016/17 season and vaccine viruses for the 2017/18 season. 第 65 回日本ウイルス 学会学術集会、大阪、2017 年 10 月
- ・ Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Sato A, Ogawa R, Miura H, Akimoto M, Sugawara H, Watanabe S, Odagiri T. Characterization of cell-derived and egg-passaged influenza A/Saitama/103/2014 (H3N2) strain. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大 阪、2017 年 10 月
- ・ 高下恵美. 発育鶏卵における臨床検体 からのインフルエンザウイルス分離. 7th Negative Strand Virus-Japan、沖 縄、2018 年 1 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし