

抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向ならびにリスク評価 および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、ベトナム、モンゴル、ミャンマー、ラオス、ネパールおよびインドの分離株について、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 A(H1N1)pdm09 株が 12 株、オセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H3N2) ウイルスが 2 株検出された。A(H3N2) 耐性ウイルスに関しては薬剤選択圧によって出現したと考えられるが、A(H1N1)pdm09 耐性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ウイルスの監視を行う必要がある。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、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は年々上昇しており、十分に検査精度が保持され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、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。世界各国で分離されるインフルエンザウイルスのほとんどは NA 阻害薬に対して感受性であるが、日本国内では 2013/2014 シーズンに札幌市を中心とする北海道内で NA 蛋白質に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行があった。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いて、NA

阻害薬耐性株の発生動向を調査し、その性状解析およびリスク評価を行った。

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、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

日本、韓国、台湾、ベトナム、モンゴル、ミャンマー、ラオス、ネパールおよびインドの分離株について、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。薬剤耐性の判定は WHO の判定基準に準じ、感受性参照株と比較して IC₅₀ 値が A 型ウイルスでは 100 倍以上、B 型ウイルスでは 50 倍以上上昇した株を耐性株と判定した。

11 箇所のコア・サポート地衛研において、感染研から配布された H275 RNA 陽性コントロールおよび Y275 RNA 陽性コントロールについて、「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver. 2」に従って 10 倍階段希釈液を製作し、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 744 株および海外株 218 株、A(H3N2) ウイルスは国内株 917 株および海外株 296 株、B 型ウイルスは国内株 1,040 株および海外株 275 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 12 株検出された。また A(H3N2) ウイルスでは、NA 蛋白質に R292K 変異をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性株が 2 株検出された。B 型ウイルスでは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。平成 28 年度には、11 箇所のうち 9 箇所の地衛研で評価項目 (1) および (2) を満

たしていた。一方、2 箇所の地衛研では、評価項目 (1) に問題があったが、機器の設定を見直した結果、再試験では問題が解決された。

平成 29 年度には、11 箇所すべてのコア・サポート地衛研で評価項目 (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 A(H3N2) ウイルスが検出された 2 名の患者は、オセルタミビルおよびペラミビルの投与を受けており、薬剤選択圧によって患者の体内で耐性ウイルスが選択的に増殖したと考えられる。一方、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 12 名の患者のうち 7 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。

コア・サポート地衛研においては、多種多様な機器および解析ソフトを用いて TaqMan RT-PCR 法が実施されたが、機器間で結果に差は認められなかった。また、今回新たに ABI QuantStudio 12K Flex での検証が行われたが、問題なく検査が実施できることが確認された。

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。

日本国内の耐性株サーベイランスでは、TaqMan RT-PCR 法の導入から 8 年が経過したが、コア・サポート地衛研において、薬剤耐性株検出系の検査精度は年々上昇しており、検査精度が十分に保持されていることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. , Characterization of a large cluster (outbreak) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan. , *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59(5), 2607-17 , 2015
- Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, Fry A, Gregory V, Leang SK, Huang W, Lo J, Pereyaslov D, Siqueira MM, Wang D, Mak GC, Zhang W, Daniels RS, Hurt AC, Tashiro M. , Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. , *Antiviral Res.* , 117, 27-38, 2015
- Sriwilaijaroen N, Suzuki K, Takashita E, Hiramatsu H, Kanie O, Suzuki Y. , 6SLN-lipo PGA specifically catches (coats) human influenza virus and synergizes neuraminidase-targeting drugs for human influenza therapeutic potential. , *J. Antimicrobial Chemotherapy.* , 70(10), 2797-809, 2015
- Zhao D, Fukuyama S, Sakai-Tagawa Y, Takashita E, Shoemaker JE, Kawaoka Y. , C646, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of histone acetyltransferase, attenuates influenza A virus infection. , *Antimicrob. Agents. Chemother.* , 60(3), 1902-6, 2015
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. , Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015. , *Jpn. J. Infect. Dis.* , 69(1), 83-6, 2016
- Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. , Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir due to a dual H275Y/G147R substitution, Japan, March 2016. , *Euro surveill.* , 21(24) , 2016
- Sakai K, Ami Y, Nakajima N, Nakajima K, Kitazawa M, Anraku M, Takayama I, Sangsriratanakul N, Komura M, Sato Y, Asanuma H, Takashita E, Komase K, Takehara K, Tashiro M, Hasegawa H, Odagiri T, Takeda M. , TMRSS2 Independency for Haemagglutinin Cleavage In Vivo Differentiates Influenza B Virus from Influenza A Virus. , *Sci. Rep.* , 6, 29430, 2016
- Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetal B, Fry A, Gubareva L, Huang W, Lackenby A, Lee RT, Lo J, Maurer-Stroh S, Nguyen HT, Pereyaslov D, Rebelo-de-Andrade H, Siqueira MM, Takashita E, Tashiro M, Tilmanis D, Wang D, Zhang W, Meijer A. , Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014-2015. , *Antiviral Res.* , 132, 178-85, 2016
- Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T. , Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of

- favipiravir., *Antiviral Res.*, 132, 170–7, 2016
- 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), 399–403, 2017
 - 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), 17735, 2017
 - 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
- Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013–2014 Influenza Season in Japan. 4th isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2015. Texas, USA.
 - Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Ozawa H, Shimizu K, Usuku S, Mitamura K, Takashita E, Fujisaki S, Odagiri T. Genetic Analysis of Influenza B Viruses Isolated During the Five Seasons in Yokohama, Japan. 4th isirv-AVG Conference; Influenza and other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management. June 2015. Texas, USA.
 - 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 白倉雅之, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 三浦秀佳, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出

- 状況. 第 47 回日本小児感染症学会. 2015 年 10 月. 福島.
- 川上千春, 七種美和子, 豊澤隆弘, 高下恵美. 横浜市における過去5シーズンのB型インフルエンザウイルスの遺伝子解析. 第 47 回日本小児感染症学会. 2015 年 10 月. 福島.
 - Takashita E, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. 第 63 回日本ウイルス学会. 2015 年 11 月. 福岡.
 - Kawakami C, Takashita E, Fujisaki S, Saikusa M, Usuku S, Odagiri T, Mitamura K. Genetic Analysis of Influenza B Viruses isolated during the Five Seasons in Yokohama. 第 63 回日本ウイルス学会. 2015 年 11 月. 福岡.
 - Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kishida N, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season. 第 63 回日本ウイルス学会. 2015 年 11 月. 福岡.
 - 高下恵美. 日本国内における NA 阻害薬耐性インフルエンザウイルス検出状況. 5th Negative Strand Virus-Japan. 2016 年 1 月. 沖縄.
 - Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre-and post-administration of favipiravir. Options IX for the Control of Influenza. August 2016. Chicago, USA.
 - Kishida N, Imai M, Aina A, Saito R, Nakamura K, Kuwahara T, Fujisaki S, Takashita E, Shirakura M, Kashiwagi Y, Tashiro M, Odagiri T, Watanabe S. Evaluation of efficacy of an inactivated whole-virus A/Victoria/361/2011

- (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
- Kawakami C, Fujisaki S, Takashita E, Saikusa M, Usuku S, Watanabe S. Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from hospitalized cases in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Doi I, 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 the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H, Akimoto M, Miura H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2015/2016 season and vaccine viruses for the 2016/17 season. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - Yasuhara A, Yamayoshi S, Ito M, Uraki R, Nakatsu S, Oishi K, Soni P, Takenaga T, Kawakami C, Takashita E, Sasaki T, Ikuta K, Yamada S, Kawaoka Y. Characterization of the antigenic properties of influenza A(H1N1)pdm09 virus. 第64回日本ウイルス学会. 2016年10月. 札幌.
 - 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, 菅原裕美, 佐藤彩, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2015/16 シーズンに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48回日本小児感染症学会. 2016年11月. 岡山.
 - 川上千春, 高下恵美, 七種美和子, 豊澤隆弘. 入院・重症例における AH1pdm09 インフルエンザウイルスの解析(2015/16 シーズン). 第48回日本小児感染症学会. 2016年11月. 岡山.
 - 高下恵美. 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. 6th Negative Strand Virus-Japan. 2017年1月. 沖縄.
 - 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. 2017年4月. 新宿.
 - 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, 渡邊佳世, 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会シンポジウム. 2017年6月. 静岡.
 - 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会シンポジウム. 2017年6月. 静岡.
 - 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. June 2017. Shanghai, China.

- 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. September 2017. Riga, Latvia.
- 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. 2016年10月. 大阪.
- 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. 2016年10月. 大阪.
- 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. 2016年10月. 大阪.
- 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. 2018年1月. 沖縄.

H. 健康危険情報

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし