

抗インフルエンザ薬耐性株の発生動向調査ならびに監視体制の強化

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発生動向の監視を目的として、日本、韓国、台湾、ネパール、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）ならびにエンドヌクレアーゼ阻害薬バロキサ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 23 株（1.4%）、バロキサビル耐性変異 A(H1N1)pdm09 株が 1 株（0.2%）検出された。耐性株は薬剤未投与患者からも検出されており、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆された。

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・向上を目的として NA 遺伝子型解析の外部精度管理を実施した。その結果、地衛研における検査精度が十分に保持されていることが確認された。また、検査の効率化を目的として PA 遺伝子型解析の新規技術開発・地衛研への技術移転を行った。以上により、日本国内における薬剤耐性株の監視体制が強化された。

A. 研究目的

日本国内において、インフルエンザの治療あるいは予防には、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、ならびに PA 蛋白質を標的とするエンドヌクレアーゼ阻害薬バロキサビルが使用されている。日本は世界最大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、薬剤耐性株の発生動向の監視を目的として、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、NA 遺伝子型解析ならびに PA 遺伝子型解析により耐性株の検出を行っている。NA 遺伝子型解析について、昨年度の 43 地衛研に続き、今年度は 10 地衛研について、検査精度の維持・向上を目的とした外部精度管理を実施した。また、PA 遺伝子型解析について、検査の効率化を目的として新規技術開発・地衛研への技術移転を行った。

B. 研究方法

感染研において、日本、韓国、台湾、ネパール、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。また、Focus reduction assay

により、バロキサビルに対する感受性試験を実施し、IC₅₀ 値を算出した。さらに次世代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。

地衛研において、TaqMan RT-PCR 法または NA 遺伝子シーケンス法によるオセルタミビル・ペラミビル耐性変異株の検索を行い、PA 遺伝子シーケンス法によるバロキサビル耐性変異株の検索を行った。また、10 箇所の地衛研に対して、TaqMan RT-PCR 法の合成 RNA 陽性コントロールを配布した。地衛研では、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検出した。さらに、12 箇所の地衛研に対して、新たに開発した RNase H2-dependent PCR 法の陽性コントロール cDNA をプロトコールとともに配布した。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

NA 阻害薬耐性株について、A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 1,657 株および海外株 20 株、A(H3N2)ウイルスは国内株 32 株および海外株 43 株、B 型ウイルスは国内株 37 株および海外株 24 株について解析を行った。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 ウイルスが 23 株 (1.4%) 検出された。また、エンドヌクレアーゼ阻害薬耐性株について、A(H1N1)pdm09 ウイルスは国内株 680 株および海外株 20 株、A(H3N2)ウイルスは国内株 42 株および海外株 43 株、B 型ウイルスは国内株 20 株および海外株 19 株について解析を行った。その結果、日本国内において、バロキサビル耐性変異 A(H1N1)pdm09 ウイルスが 1 株 (0.2%) 検出された。国内株の解析結果は感染研ウェブサイト上で公表し、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。

NA 遺伝子型解析の外部精度管理では、評価項目を (1) 反応条件および解析条件は正しく設定されているか、(2) 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、(3) H275 陽性コントロールおよび Y275 陽性コントロールにそれぞれ濃度依存性があるか、(4) 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 4 点とした。その結果、参加地衛研では評価項目すべてを満たしていた。PA 遺伝子型解析については、新たに RNase H2-dependent PCR 法を開発し、地衛研への技術移転を行った。

D. 考察

抗インフルエンザ薬耐性株は薬剤未投与患者からも検出されており、ヒトからヒトへの感染伝播の可能性が示唆された。

NA 遺伝子型解析の外部精度管理では、昨年度の 43 地衛研に加えて、今年度の 10 地衛研についても検査精度が保持されてい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・ペラミビル耐性ウイルスおよびバロキサビル耐性変異ウイルスはヒトからヒトへの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。

地衛研では薬剤耐性株検出系の検査精度が十分に保持されており、さらに検査が効率化されることで抗インフルエンザ薬耐性株の監視体制が強化された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ [Takashita E](#), Ichikawa M, Morita H, Ogawa

- R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111
- Sato M, Takashita E, Katayose M, Nemoto K, Sakai N, Hashimoto K, Hosoya M. Detection of variants with reduced baloxavir marboxil susceptibility after treatment of children with influenza A during the 2018/2019 influenza season. *J Infect Dis.* 2020, 2 DOI: 10.1093/infdis/jiaa061
 - Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza Other Respir Viruses.* 2020, 2, doi: 10.1111/irv.12728
 - Takashita E. Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020, 3 doi: 10.1101/cshperspect.a038687
 - Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Lackenby A, Nguyen HT, Pereyaslov D, Roe M, Samaan M, Subbarao K, Tse H, Wang D, Yen HL, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017-2018. *Antiviral Res.* 2020, 3, 175, 104718
 - 高下恵美, 森田博子, 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, 秋元未来, 佐藤彩, 菅原裕美, 渡邊真治, 小田切孝人 2018/19 シーズン バロキサビル耐性変異株検出状況の中間報告 IASR vol. 40, 86-87
 - 高下恵美, 小川理恵, 森田博子, 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, 秋元未来, 佐藤彩, 菅原裕美, 渡邊真治, 小田切孝人, 矢野拓弥, 赤地重宏, 松村義晴, 落合仁, 川上千春, 清水耕平, 小澤広規, 宇宿秀三, 田中伸子, 大久保一郎, 太田陽, 富樫勇人, 田中文字子, 齋藤綾子, 市川正孝, 三田村敬子, 安倍隆, 山崎雅彦 全国地方衛生研究所. 新規抗インフルエンザ薬バロキサビル未投与患者からのバロキサビル耐性変異ウイルスの検出 IASR vol.40, 67-69
 - 高下恵美, 森田博子, 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, 長谷川秀樹, 市川正孝, 三田村敬子, 安倍隆, 山崎雅彦 全国地方衛生研究所. バロキサビル耐性変異ウイルスのヒトからヒトへの感染伝播 IASR vol. 40, 197-199
2. 学会発表
- 高下恵美, 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス、第 93 回日本感染症学会、2019 年 4 月、名古屋
 - 高下恵美, インフルエンザウイルスのグローバルサーベイランス、第 60 回日本臨床ウイルス学会、2019 年 5 月、名

- 古屋
- 高下恵美、新規抗インフルエンザ薬バロキサビルに対する耐性株サーベイランス、第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2019年6月、京都
 - 市川正孝、高下恵美、安倍隆、山崎雅彦、三田村敬子、2018/2019 インフルエンザシーズンにおけるバロキサビル耐性変異ウイルスの臨床的検討、第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2019年6月、京都
 - Emi Takashita, Rie Ogawa, Hiroko Morita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore
 - Masatoki Sato, Emi Takashita, Masahiko Katayose, Kenji Nemoto, Nobuko Sakai, Koichi Hashimoto, Mitsuaki Hosoya, Clinical and virological efficacy of baloxavir marboxil in children with influenza A, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore
 - Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Hitoshi Takahashi, Kayoko Sato, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Biological significance of neuraminidase of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore
 - Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri, Shinji Watanabe, Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore
 - 高下恵美、インフルエンザウイルスの薬剤耐性株サーベイランス、第33回日本臨床内科医学会、2019年10月、広島
 - 高下恵美、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、三田村敬子、安倍隆、市川正孝、山崎雅彦、渡邊真治、小田切孝人、長谷川秀樹、2018/2019 シーズンにおける新規抗インフルエンザ薬バロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、第51回日本小児感染症学会、旭川
 - 佐藤晶論、高下恵美、片寄雅彦、根本健二、酒井信子、橋本浩一、細矢光亮、バロキサビルの臨床的・ウイルス学的効果の検討、第51回日本小児感染症学会、旭川
 - 川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、齋藤綾子、山下舞子、田中文子、太田陽、富樫勇人、横浜市におけるバロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、第51回日本小児感染症学会、

- 旭川
- 市川正孝、高下恵美、安倍隆、山崎雅彦、三田村敬子、2018/2019 インフルエンザシーズンにおけるバロキサビル耐性変異ウイルスの臨床的検討、第 51 回日本小児感染症学会、旭川
 - 山下舞子、太田陽、大砂光正、高尾知穂、富樫勇人、中澤枝里子、杉山弘樹、永嶋早織、山口和子、齋藤千穂、鈴木徹臣、立石格、田中文子、川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、バロキサビル耐性インフルエンザ A/H3N2 感染により皮下気腫、縦隔気腫を来たした一例、第 51 回日本小児感染症学会、旭川
 - Emi Takashita, Hiroko Morita, Rie Ogawa, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Hiromi Sugawara, Aya Sato, Miki Akimoto, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, Human-to-human transmission of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA I38T substitution in Japan, 第 67 回日本ウイルス学会、2019 年 10 月、東京
 - Kazuya Nakamura, Miki Akimoto, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Hideka Miura, Noriko Kishida, Aya Sato, Tomoko Kuwahara, Emi Takashita, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri, Shinji Watanabe, Improved accuracy of antigenic characterization of recent influenza A/H3N2 isolates by modified focus reduction assay, 第 67 回日本ウイルス学会、2019 年 10 月、東京
 - Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Miki Akimoto, Hideka Miura, Rie Ogawa, Hiroko Morita, Hiromi Sugawara, Takato Odagiri, Hideki Hasegawa, The influenza Surveillance Group of Japan, Characterizations of circulating influenza viruses in the 2018/19 season and selection of vaccine viruses for the 2019/20 season, 第 67 回日本ウイルス学会、2019 年 10 月、東京
 - Mina Nakauchi, Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Shinji Saito, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama, Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil, 第 67 回日本ウイルス学会、2019 年 10 月、東京
 - 高下恵美、森田博子、永田志保、藤崎誠一郎、白倉雅之、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、渡邊真治、長谷川秀樹、2018-19 シーズンにおけるバロキサビル耐性変異ウイルスの検出状況、9th Negative Strand Virus-Japan、2020 年 1 月、沖縄