

## 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、ミャンマー、モンゴル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 13 株（1.5%）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。バロキサビル耐性変異株は検出されなかった。

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、評価項目に基づいて個別に助言を行った。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および助言を行った。以上により、日本国内における薬剤耐性株の監視体制がさらに強化された。

### 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、昨年度までの 53 地衛研に続き、今年度は 3 地衛研に対して、検査精度の維持・向上を目的とした外部精度管理および助言を行った。また、PA 遺伝子型解析について、今年度は 2 地衛研に対して、検査の効率化を目的として開発した新規技術の移転および助言を行った。

### B. 研究方法

感染研において、日本、韓国、台湾、ネパール、ミャンマー、モンゴル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

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、新たに開発した RNase H2-dependent PCR 法または 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、2 地衛研に対して、TaqMan RT-PCR 法の合成 RNA 陽性コントロールおよびプライマー・プローブミックスを配布した。さらに、1 地衛研に対して、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 839 株および海外株 25 株、A(H3N2) ウイルスは国内株 63 株および海外株 24 株、B 型ウイルスは国内株 119 株および海外株 7 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 13 株 (1.5%) 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 324 株および海外株 55 株、A(H3N2) ウイルスは国内株 212 株および海外株 82 株、B 型ウイルスは国内株 319 株および海外株 26 株について解析を行った。その結果、バロキサビル耐性変異ウイルス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。2 地衛研については評価項目のいずれかに問題があり、個別に問題解決のための助言を行った。PA 遺伝子型解析については、新たに開発した RNase H2-dependent PCR 法について、2 地衛研への技術移転および助言を行った。

### 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 遺伝子型解析ならびに PA 遺伝子型解析では、地衛研に個別に助言を行うことで改善が認められた。

### E. 結論

日本国内において検出された耐性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。

地衛研における薬剤耐性株検出系の検査精度の維持には、継続的な外部精度管理が効果的である。また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さらに強化された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ・ Takashita E. Influenza Polymerase Inhibitors: Mechanisms of Action and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2021 3, 11(5), a038687
- ・ Takashita E, Yasui Y, Nagata S, Morita H, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Kaido T, Watanabe S, Hasegawa H; Influenza Virus

Surveillance Group of Japan. Detection of a Peramivir-Resistant Influenza B/Yamagata-Lineage Virus Imported from Indonesia in Aichi, Japan, March 2019. Jpn J Infect Dis. 2020 9, 73(5), 386-390

- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Morita H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sato H, Doi I, Sato Y, Takao S, Shimazu Y, Shimomura T, Ito T, Watanabe S, Odagiri T, The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. In Vitro Characterization of Multidrug-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Carrying a Dual Neuraminidase Mutation Isolated from Immunocompromised Patients. Pathogens. 2020 9, 9(9), 725
- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, Fujisaki S, Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. Antiviral Res. 2020 8, 180, 104828

## 2. 学会発表

- 川上千春、七種美和子、清水耕平、小澤広規、宇宿秀三、高下恵美、藤崎誠一郎、中村一哉、岸田典子、渡邊真治、過去3シーズンに流行した AH1pdm09 インフルエンザウイルスの解析、第52回日本小児感染症学会、2020年11月、大阪
- Emi Takashita, Antiviral resistance: frequency of resistance, impact on patient, risk of transmission, APACI 2020 Webinar Series on Pandemic Preparedness, December 2020, Web

## G. 知的財産権の出願・登録状況

- なし