

## 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よる監視体制の強化

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 株が検出された。また、日本国内において、バロキサビル耐性変異株が A(H1N1)pdm09 と A(H3N2)で検出された。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ならびに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、国内外の分離株について、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、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、TaqMan RT-PCR 法の合成 RNA 陽性コントロールを、新たに地衛研に配布した。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 倍階段希釈液を製作し、陰性コントロールと共に検出した。さらに、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地衛研に配布した。

(倫理面への配慮)  
該当なし

## C. 研究結果

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解析を行った。その結果、NA 阻害薬耐性株については、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 A(H1N1)pdm09 ウイルスが 0.8–1.5% 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は、日本国内において、PA 蛋白質に I38X 耐性変異をもつバロキサビル耐性変異ウイルスが平成 30 年度には A(H1N1)pdm09 で 2.3%、A(H3N2) で 18.5% 検出された。また、PA 蛋白質に E23K 耐性変異をもつバロキサビル耐性変異ウイルスが令和元年度に 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、8 割以上の地衛研で評価項目 (1) ~ (4) すべてを満たしていた。評価項目のいずれかに問題があった地衛研に対しては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 RNase H2-dependent PCR 法を開発し、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。

地衛研での NA 遺伝子型解析ならびに PA 遺伝子型解析については、検査に問題があった地衛研に対して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, 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
- 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
  - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. Jpn J Infect Dis. ,71(3),234-238,2018
  - Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Leang SK, Lee RTC, Lo J, Lollis L, Maurer-Stroh S, Odagiri T, Pereyaslov D, Takashita E, Wang D, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016-2017. Antiviral Res. , 157 , 38-46 , 2018
  - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. Front Microbiol. ,6;9,3026,2018
  - Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. Euro Surveill. ,24(3),op,2019
  - Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. Euro Surveill. , 24(12), 2019
2. 学会発表
- Takashita E, Antiviral resistance: frequency of resistance, impact on patient, risk of transmission, APACI 2020 Webinar Series on Pandemic Preparedness, December 2020, Web
  - 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
  - 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
  - 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、2019年10月、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、2019年10月、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、2019年10月、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、2019年10月、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、縦隔気腫を来した一例、第51回日本小児感染症学会、2019年10月、旭川
  - ・ Takashita E, 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, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, Hasegawa H, 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
  - ・ Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S, 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
  - ・ Watanabe S, Nakamura K, Kishida N, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Morita H, Sugawara H, Odagiri T, Hasegawa H, 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
  - ・ Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, T 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
  - ・ Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, T 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
  - ・ Takashita E, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A, Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, 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
  - ・ Sato M, Takashita E, Katayose M, Nemoto K, Sakai N, Hashimoto K, Hosoya M, Clinical and virological efficacy of baloxavir marboxil in children with influenza A, Options X for the Control of Influenza, August 2019, Singapore

- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Sato K, Watanabe S, Odagiri T, 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
- Nakamura K, Akimoto M, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Kishida N, Sato A, Kuwahara T, Takashita E, Hasegawa H, Odagiri T, Watanabe S, 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, 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
- 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、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、森田博子、小川理恵、中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、桑原朋子、岸田典子、三浦秀佳、秋元未来、佐藤彩、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人。新規抗インフルエンザ薬バロキサビルマルボキシビルに対する耐性株サーベイランス。8th Negative Strand Virus-Japan. 2019年1月、沖縄
- Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. 6th isiv Antiviral Group Conference, November 2018, Washington DC, USA
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 第66回日本ウイルス学会学術集会. 2018年10月. 京都.
- Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Takashita E, Kuwahara T, Kishida N, Sato A, Akimoto M, Miura H, Ogawa R, Sugawara H, Watanabe K, Morita H, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Odagiri T, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season. 第66回日本ウイルス学会学術集会. 2018年10月. 京都.
- Kisu T, Ito H, Hagiwara A, Watanabe O, Kadji NFM, Sato K, Omiya S, Takashita E, Nobusawa E, Nishimura H. Induction of neuraminidase inhibitory antibody in recipients of an influenza split vaccine. 第66回日本ウイルス学会学術集会. 2018年10月. 京都.
- Takashita E, Fujisaki S, Yokoyama M, Shirakura M, Nakamura K, Kuwahara T, Kishida N, Sato H, Watanabe S, Odagiri T. In vitro characterization of multidrug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors. 2018 Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. June 2018. Verona, Italy.
- Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of

egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin. Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. June 2018. Verona, Italy.

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

- ・ なし