

原 著

抗インフルエンザ薬バロキサビル マルボキシルにおける耐性変異を有する季節性A型インフルエンザウイルスの動向把握-三重県（2018/19シーズン）

矢野拓弥，赤地重宏，松村義晴

Epidemic trend of seasonal influenza A viruses with a baloxavir marboxil - resistant mutation - Mie prefecture, Japan, (2018/19 season)

Takuya YANO, Shigehiro AKACHI and Yoshiharu MATSUMURA

2018年10月から2019年4月までに三重県で分離されたA(H1N1)pdm09ウイルス（28株）およびA(H3N2)ウイルス（29株）について，新規の抗インフルエンザ薬であるバロキサビル マルボキシル（バロキサビル）に対する耐性変異の指標であるPolymerase acidic subunit（PA）遺伝子の38番目のアミノ酸配列解析を実施した。

2018年11月にバロキサビルの投薬歴がない小児患者から分離されたA(H3N2)ウイルス（1株）はPA I38T耐性変異を有していた。この患児はバロキサビル未投与であったことから，バロキサビルの投与により選択的に患者体内でPA I38T耐性変異ウイルスが増殖した可能性は否定された。本事例はPA I38T耐性変異ウイルスが，ヒトからヒトへ伝播した可能性を示唆している。

キーワード：抗インフルエンザ薬，バロキサビル マルボキシル，薬剤感受性試験，抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス

はじめに

我が国における抗インフルエンザ薬の消費量は世界随一で¹⁾，2017年10月～2018年3月の消費量は約1,397万人分であった²⁾。2008/09シーズンに，北欧を由来とするオセルタミビル耐性ウイルス（AH1N1ウイルス：Aソ連型）が急速に広がり，国内におけるオセルタミビル耐性ウイルスの検出割合は2007/08シーズンの2.6%から2008/09シーズンは99.6%へと大幅に増加に転じオセルタミビル耐性ウイルスの蔓延が明らかになった³⁾。これらの背景から薬剤耐性ウイルスの出現の際には治療薬剤の選択戦略が必要となるため，継続的な薬剤耐性ウイルスの動向把握が必要となる。

薬剤耐性ウイルスの動向について迅速な情報発信が医療機関や保健所等の関係機関から求められているなかで，国内では国立感染症研究所と

全国地方衛生研究所が共同でオセルタミビル，ザナミビル，ペラミビル，ラニナミビルおよびアマタジンに対する抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスが実施され，全国の検出状況がWeb上で迅速に公開されている⁴⁾。さらに2018年3月より使用可能となった新規の抗インフルエンザ薬であるキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤バロキサビル マルボキシル（バロキサビル；商品名ゾフルーザ）が2017/18シーズンより抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスに追加された⁵⁾。

2018年12月には横浜市においてバロキサビル投与後の患者2名から分離されたA(H3N2)ウイルスはバロキサビル耐性変異を有するウイルスであった。その後，三重県において遡り調査を実施したところ，2018年11月にバロキサビル未投与の

Table 1 Detection of A (H1N1)pdm09 virus with PA I38T/M/F resistance mutation - Mie Prefecture (2018/19 Season)

No.	Disease onset date			Specimen collection date			Age in years	Antiviral treatment	PA substitution (PA I38T/M/F)	Body temperature (°C)
1	2018	10	26	2018	10	29	2	No medication	I 38 I	39.8
2	2018	11	1	2018	11	2	9M	No medication	I 38 I	39.3
3	2018	11	4	2018	11	5	4	Unknown	I 38 I	37.9
4	2018	11	14	2018	11	5	9	Unknown	I 38 I	40.2
5	2018	11	4	2018	11	15	44	Unknown	I 38 I	39
6	2018	11	29	2018	11	29	4	Unknown	I 38 I	39.5
7	2018	11	29	2018	11	30	6	Unknown	I 38 I	39.3
8	2018	12	2	2018	12	3	6	Unknown	I 38 I	39.1
9	2018	12	3	2018	12	4	9	Unknown	I 38 I	37.8
10	2018	12	3	2018	12	4	7	Unknown	I 38 I	39
11	2018	12	7	2018	12	7	10	Unknown	I 38 I	39
12	2018	12	5	2018	12	5	7	Unknown	I 38 I	39.6
13	2018	12	6	2018	12	7	6	Unknown	I 38 I	39.7
14	2018	12	18	2018	12	19	8	Unknown	I 38 I	39.5
15	2018	12	16	2018	12	17	11	Unknown	I 38 I	38.8
16	2018	12	21	2018	12	17	14	Unknown	I 38 I	39.4
17	2018	12	21	2018	12	14	12	Unknown	I 38 I	38
18	2018	12	20	2018	12	21	7	No medication	I 38 I	39.6
19	2018	12	20	2018	12	21	9	Unknown	I 38 I	39.7
20	2019	1	8	2019	1	8	1	No medication	I 38 I	39.2
21	2019	1	21	2019	1	22	8	No medication	I 38 I	38.5
22	2019	1	24	2019	1	24	3	Unknown	I 38 I	39.4
23	2019	3	7	2019	3	7	9	Unknown	I 38 I	38.7
24	2019	3	8	2019	3	8	9	Unknown	I 38 I	38
25	2019	3	10	2019	3	11	9	Unknown	I 38 I	39.9
26	2019	3	11	2019	3	15	73	No medication	I 38 I	38.4
27	2019	3	5	2019	3	15	71	Medication	I 38 I	40
28	2019	3	21	2019	3	22	1	Unknown	I 38 I	38.6

小児患者1名から耐性変異を有するA(H3N2) ウイルスが分離された⁴⁾。

そこで三重県内におけるバロキサビル耐性変異ウイルスの浸潤状況を把握するために、2018/19シーズンに本県で分離された季節性A型インフルエンザウイルス (A(H1N1)pdm09ウイルス, A(H3N2)ウイルス) について調査したので概要を以下に報告する。

対象と方法

1. 調査対象

1) 調査期間

2018年10月～2019年4月に三重県感染症発生动向調査事業において、県内の医療機関を受診し

インフルエンザと診断された患者から分離された季節性A型インフルエンザウイルス株 (A(H1N1)pdm09ウイルス株, A(H3N2)ウイルス株) を対象とした。

2) 検体採取月

使用したA(H1N1)pdm09ウイルスの検体採取月別調査数は2018年10月1株、11月6株、12月12株、2019年1月3株、2月0株、3月6株の計28株である (Table1)。使用したA(H3N2)ウイルスの検体採取月別調査数は2018年10月3株、11月2株、12月4株、2019年1月10株、2月7株、3月1株、4月2株の計29株である (Table2)。

Table 2 Detection of A (H3N2) virus with PA I38T/M/F resistance mutation - Mie Prefecture (2018/19 Season)

No.	Disease onset date			Specimen collection date			Age in years	Antiviral treatment	PA substitution (PA I38T/M/F)	Body temperature (°C)
1	2018	10	18	2018	10	19	4	Unknown	I 38 I	39.8
2	2018	10	18	2018	10	19	9	Unknown	I 38 I	39
3	2018	10	19	2018	10	19	9	Unknown	I 38 I	38.7
4	2018	11	5	2018	11	6	7	No medication	I 38 I	38.9
5	2018	11	20	2018	11	21	12	No medication	I 38 T *	37.8
6	2018	12	12	2018	12	14	3	No medication	I 38 I	39.7
7	2018	12	18	2018	12	19	9 months	Unknown	I 38 I	40.2
8	2018	12	22	2018	12	22	11	Unknown	I 38 I	39.4
9	2018	12	24	2018	12	25	4	No medication	I 38 I	39.1
10	2018	12	31	2019	1	4	2	No medication	I 38 I	38.9
11	2019	1	7	2019	1	7	4	Unknown	I 38 I	39
12	2019	1	5	2019	1	7	6	No medication	I 38 I	40
13	2019	1	10	2019	1	11	7	Unknown	I 38 I	39
14	2019	1	11	2019	1	11	4	No medication	I 38 I	40.1
15	2019	1	14	2019	1	15	7	Unknown	I 38 I	39
16	2019	1	14	2019	1	15	4	Unknown	I 38 I	39.6
17	2019	1	16	2019	1	16	9	Unknown	I 38 I	39
18	2019	1	22	2019	1	23	9	Unknown	I 38 I	39.8
19	2019	1	27	2019	1	29	6	No medication	I 38 I	39.9
20	2019	1	30	2019	2	1	5	Unknown	I 38 I	39.2
21	2019	2	3	2019	2	4	2	Unknown	I 38 I	38.8
22	2019	2	13	2019	2	13	3	Unknown	I 38 I	38.4
23	2019	2	16	2019	2	16	6	Unknown	I 38 I	39.1
24	2019	2	17	2019	2	18	4	Unknown	I 38 I	39.8
25	2019	2	17	2019	2	18	4	Unknown	I 38 I	39.9
26	2019	2	24	2019	2	25	10	Unknown	I 38 I	39
27	2019	3	9	2019	3	11	13	Unknown	I 38 I	39.4
28	2019	4	4	2019	4	6	13	No medication	I 38 I	40
29	2019	4	15	2019	4	19	3	No medication	I 38 I	40.4

3) 患者情報

対象となった調査協力者あるいは小児の保護者から患者情報（年齢，投薬歴，臨床症状）および患者検体の使用に関する承諾書への署名を得た。当研究所へ調査を依頼した医療機関において記入された調査票（患者情報）の使用にあたっては，倫理的配慮として，個人情報保護などに留意し実施した。

2. PA遺伝子解析によるI38T/M/F耐性変異検出状況

本県で分離されたA(H1N1)pdm09ウイルス株およびA(H3N2)ウイルス株についてQIAamp Viral RNA

Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。抽出RNAは使用時まで-80°Cに保存し，Polymerase acidic subunit (PA) 遺伝子の検出に使用した。

臨床試験により季節性インフルエンザウイルス (A(H1N1)pdm09ウイルス，A(H3N2)ウイルス) のバロキサビル耐性変異の指標⁵⁾とされるPA遺伝子の検出には国立感染症研究所のインフルエンザ診断マニュアル⁶⁾に記載のConventional-RT-PCR法により実施した。検出したPA遺伝子は塩基配列を決定し，PA遺伝子の38番目のアミノ酸についてはIsoleucine (I) がThreonine (T)，Methionine (M) あるいはPhenylalanine (F) への置換 (I38T, I38M,

I38F)の有無を調べ、バロキサビル耐性変異ウイルスの判別を行った。

3. 薬剤感受性試験

PA遺伝子の38番目のアミノ酸がI38T, I38MあるいはI38Fのいずれかの置換を有する耐性変異が確認された場合は、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にて、各種抗インフルエンザ薬における(バロキサビル, オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビル, ラニナミビル)の薬剤感受性試験を実施した^{7,8)}。なお、オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビル, ラニナミビルはMUNANA基質を用いた蛍光法により測定し、バロキサビルはFocus reduction assayにより薬剤感受性試験を実施した。

結果

1. I38T/M/F耐性変異検出状況

1) A(H1N1)pdm09ウイルス

本県で2018年10月から3月に分離されたA(H1N1)pdm09ウイルス(28株)について、PA遺伝子のアミノ酸配列解析を実施したところ、調査期間中に分離されたA(H1N1)pdm09ウイルスからはI38T, I38MあるいはI38FのいずれのPAアミノ酸置換は確認されず、全てバロキサビル感受性ウイルスであった(Table1)。

2) A(H3N2)ウイルス

本県で2018年10月から4月までに分離されたA(H3N2)ウイルス(29株)について、PA遺伝子のアミノ酸配列解析を実施したところ、2018年11月に発熱、咳等の症状を呈する小児患者(12歳;男児)から分離されたA(H3N2)ウイルス(1株)はPA I38T耐性変異を有するウイルス(A/三重/41/2018)であった(Table2)。

このPA I38T耐性変異を有するA(H3N2)ウイルスが分離された患児に関する投薬歴等の疫学情報は県内の医療機関を2018年11月下旬に受診したが、本患児には、バロキサビルやオセルタミビルを含む抗インフルエンザ薬の投薬歴は無く、当該医療機関では、本患児以外の患者についても、バロキサビル使用歴は無かった。また本患児の近親者の、直近のインフルエンザ罹患歴および抗インフルエンザ薬の投与歴は不明であった。

2. 薬剤感受性試験

本県で確認されたPA I38T耐性変異ウイルス(A/三重/41/2018)について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にて、各種抗インフルエンザ薬(バロキサビル, オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビル, ラニナミビル)に

対する薬剤感受性試験を実施した。各種抗インフルエンザ薬に対するウイルスの感受性は、薬剤感受性試験により算出されるIC₅₀値(50%阻害する薬剤濃度)によって表される。オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビル, ラニナミビル, バロキサビルに対するIC₅₀値は0.31nM, 0.14nM, 0.68nM, 0.97nM, 702.97nMで、各種感受性参照株と比較してバロキサビルに対する感受性が低下していた。

考察

我が国では2018/19シーズンよりバロキサビル薬剤耐性株サーベイランス体制が整備され、全国規模における積極的な調査が実施されている^{1,7)}。

2018年12月に横浜市から分離されたA(H3N2)ウイルス2株はバロキサビルが投与された患者からのPA I38T耐性変異ウイルスの検出事例であった^{7,8)}。これらは患者体内でバロキサビルの投与により患者体内で選択的に増殖した可能性が示される事例であった^{7,8)}。

また、バロキサビル未投与の患者からの国内最初のPAアミノ酸のI38T耐性変異の報告例は、2019年1月から2019年2月にかけて神奈川県でバロキサビル未投与の患者2名から分離されたA(H3N2)ウイルス2株であった⁹⁾。

今回、本県において遡ってPA耐性変異(I38T, I38M, I38F)を有するウイルスの検索を実施したところ、2018年11月にバロキサビル未投与の小児患者から分離されたA(H3N2)ウイルス1株よりPA I38T耐性変異が確認され、薬剤感受性試験においてもバロキサビルに対する感受性が低下していた。このことは、バロキサビルの投与により患児の体内で選択的にPA I38T耐性変異ウイルスが増殖した可能性は否定され、PA I38T耐性変異ウイルスが、ヒトからヒトへ伝播した可能性を示唆する事例であった。PA I38T耐性変異ウイルスが分離された患者では感受性ウイルスが分離された患者と比べて罹病期間が長引くことが示唆され、この要因として患者体内においてウイルスが再増殖することが報告^{5,10)}がされているが、三重県において本事例(2018年11月)以降の患者からは、PA I38T耐性変異ウイルスを有するA(H3N2)ウイルスは確認されておらず拡散の兆候はみられていない。なお、現在のところ、本県で分離されたA(H1N1)pdm09ウイルス株においても、I38T, I38MあるいはI38Fのいずれかのアミノ酸置換を有する耐性変異ウイルスは確認されていない。

これまでに、国内において、バロキサビル耐性変異を有するウイルスは、A(H1N1)pdm09ウイルス5株, A(H3N2)ウイルス30株確認¹⁾された。なお、現在のところ、B型インフルエンザウイルスからはバロキサビル耐性変異は確認されていない

(2019年6月中旬集計) . これらの耐性変異ウイルスのうちA(H1N1)pdm09ウイルスの5株は全てバロキサビル投与歴のある患者であった。一方で、A(H3N2)ウイルスは30株のうち4株は投薬歴のない患者から分離されていた。このことは異なる抗インフルエンザ薬ではあるが、2013年11月～2014年初めに、札幌市を中心に発生したオセルタミビル耐性ウイルスの地域流行¹¹⁾のように、ヒトからヒトへの伝播による感染拡大が憂慮される。

現在のところ調査数は少なく、今後、国内でのバロキサビル耐性変異ウイルスの動向を見極めるためにも、積極的かつ継続的な動向監視を行い、多くの症例の解析で科学的根拠を蓄積し、適正な評価に繋げていくことが必要である。

謝 辞

本報告を行うにあたり、抗インフルエンザ薬の感受性試験を実施して頂きました国立感染症研究所の諸先生方にお礼申し上げます。

三重県感染症発生動向調査事業で検体採取を担当された医療機関の諸先生方および各保健所、関係各位に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス、(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/influ-resist.html>) .
- 2) 厚生労働省：平成30年度 今冬のインフルエンザ総合対策について、(<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/influenza/index.html>) .
- 3) Ujike M, Shimabukuro K, Mochizuki K et al : Oseltamivir-resistant A/H1N1 viruses during the 2007-2009 influenza seasons, Japan. *Emerg Infect Dis* **16** : 926-935 (2010).
- 4) 高下恵美, 小川理恵, 森田博子 他 : 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, 病原微生物検出情報, **40** , 67-69 (2019).
- 5) Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep.* 2018;8: 9633.
- 6) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル (第4版) , (平成30年12月)
- 7) Takashita E, Morita H, Ogawa R, et al. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Front Microbiol.* 2018;9: 3026.
- 8) Takashita E, Kawakami C, Morita H, et al. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. *Euro Surveill.* 2019;24: pii=1800698.
- 9) Takashita E, Kawakami C, Ogawa R et al. 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 .* 2019;24: pii=1900170.
- 10) Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, et al. Baloxavir marboxil for uncomplicated influenza in adults and adolescents. *N Engl J Med.* 2018;379: 913-923.
- 11) Takashita E, Ejima M, Itoh R et al : A community cluster of influenza A(H1N1) pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* **19**:pii: 20666 (2014).

Epidemic trend of seasonal influenza A viruses with a baloxavir marboxil - resistant mutation - Mie prefecture, Japan, (2018/19 season)

Takuya YANO, Shigehiro AKACHI and Yoshiharu MATSUMURA

Keywords: Anti-influenza drug, Baloxavir marboxil, Antiviral susceptibility test, Antiviral resistance influenza virus surveillance

Substitution of the Isoleucine 38 of the influenza virus polymerase acidic subunit (PA) to Threonine (PA I38Tmutation) is an indicator of anti-influenza drug, baloxavir marboxil-resistant mutation. To understand the epidemic trend of baloxavir marboxil-resistant viruses, we conducted a sequence analysis of the PA gene of influenza A(H1N1)pdm09 virus (25 strains) and influenza A(H3N2) virus (29 strains) which were isolated in Mie prefecture between October 2018 and April 2019.

Our analysis revealed that influenza A(H3N2) virus isolated from a child patient without prior baloxavir treatment possesses the baloxavir-resistant PA I38T mutation. Since this patient has never received baloxavir treatment, There for, it has been denied that the administration of baloxavir allowed the PA I38 mutant virus to selectively propagate in this patient.

This result suggests a possible acquisition of the PA I38T mutant virus by human-to-human transmission.