

ノート

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インフルエンザウイルスの動向把握-三重県(2019年5月~2024年10月)

矢野拓弥, 川合秀弘, 下尾貴宏

Epidemic trend of seasonal influenza viruses with a baloxavir marboxil - resistant mutation - Mie prefecture, Japan, (May 2019 ~ October 2024)

Takuya YANO, Hidehiro KAWAI and Takahiro SHIMOO

2019年5月から2024年10月までに三重県感染症発生動向調査事業において分離・検出されたA/H1N1pdm09インフルエンザウイルス(63件)およびA/H3N2インフルエンザウイルス(94件)およびB型インフルエンザウイルス(ビクトリア系統)(48件)について, 抗インフルエンザ薬であるバロキサビル マルボキシルに対する耐性変異の指標であるPolymerase acidic subunit (PA) 遺伝子のアミノ酸配列解析を実施した. 調査期間中のバロキサビル マルボキシル耐性変異の検出状況は, A/H1N1pdm09ウイルスは63件中1件(1.6%), A/H3N2ウイルスは94件中1件(1.1%)から本薬剤の耐性変異が確認され, この2例は本薬剤未投与の患者から検出された事例であった. またA/H1N1pdm09ウイルスは, バロキサビル耐性変異のPA (I38T) 耐性変異を有するウイルスであった. 一方でA/H3N2ウイルスは, 異なるアミノ酸によるPA (I38V) 耐性変異を獲得していた.

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, 耐性変異

はじめに

我が国では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, 2018年3月より使用可能となり, 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新たに追加され, 全国規模での積極的な調査が実施されている^{1,2)}. これまでの本サーベイランスにおけるPolymerase acidic subunit (PA) 遺伝子のアミノ酸配列解析によるバロキサビル耐性変異の検出結果より, 2018年12月に横浜市で分離されたA/H3N2インフルエンザウイルス(A/H3N2ウイルス)は, バロキサビルが投与された患者(2名)からPA I38T耐性変異ウイルスが検出された^{2,3)}. また, 2019年1月~2月に神奈川県(2名)から分離されたA/H3N2ウイルス

は国内最初のバロキサビル未投与の患者からの報告例であった⁴⁾. その後, 本県において時期を遡ってPA耐性変異の検索を実施したところ, 神奈川県(報告より以前の2018年11月にバロキサビル未投与の小児患者(1名)から分離されたA/H3N2ウイルスは, PA I38T耐性変異株と確認され, 国内初期のPA I38T耐性変異ウイルスによるヒトからヒトへ伝播を示唆する事例であった^{5,6)}. そこで既報⁶⁾にて報告した2019年5月以降に本県で分離・検出されたA/H1N1pdm09インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm09ウイルス), A/H3N2ウイルス, B型インフルエンザウイルスのビクトリア系統(B型ビクトリア系統)について, バロキサビル耐性変異ウイルスの浸潤状況把握のため, 調査を行ったので報告する.

表1 季節性インフルエンザウイルスのパロキサビル マルボキシル耐性変異遺伝子調査数

採取年	調査数	A/H1N1pdm09 ウイルス	A/H3N2 ウイルス	InfB (ビクトリア系統)
2019年5月～12月	53	32	7	14
2020年	20	9	1	10
2021年	0	0	0	0
2022年	6	0	6	0
2023年	88	12	71	5
2024年1月～10月	38	10	9	19
計	205	63	94	48

対象と方法

1. 調査対象

1.1 調査期間と対象

三重県感染症発生動向調査事業において、2019年5月～2024年10月の間に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・検出された205件の季節性インフルエンザウイルスを調査対象とした。

パロキサビル耐性変異ウイルスの解析に使用したインフルエンザウイルス亜型別の調査数は、A/H1N1pdm09ウイルス（63件）、A/H3N2ウイルス（94件）、B型ビクトリア系統（48件）を用いた。

検体採取年別の調査数は、2019年（5月～12月）53件、2020年20件、2021年0件、2022年6件、2023年88件、2024年（1月～10月）38件である（表1）。

なお、2021年～2022年は COVID-19の流行禍の防疫措置等の影響によりインフルエンザ発生が抑制されインフルエンザの検体収集が困難であった。

1.2 患者情報

対象とした調査協力者あるいは小児患者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。

なお、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遺伝子耐性変異解析

本県で分離・検出されたA/H1N1pdm09ウイルス、A/H3N2ウイルスおよびB型ビクトリア系統について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℃

に保存し、PA遺伝子の耐性変異解析に使用した。

2.1 PA耐性変異の塩基配列解析

臨床試験によりインフルエンザウイルスのパロキサビル耐性変異の指標⁷⁾とされるPA遺伝子の耐性マーカー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⁸⁾に従い実施した。

検出したPA遺伝子の塩基配列を決定し、PA遺伝子の38番目のアミノ酸についてIsoleucine (I) がThreonine (T)、Methionine (M) あるいはPhenylalanine (F) への置換 (I38T, I38M, I38F等)の有無を調べ、パロキサビル耐性変異ウイルスの判別を行った。

なお、一部の検体については、他のアミノ酸変異を探るためインフルエンザ診断マニュアル⁸⁾に記載の次世代シーケンサーによるゲノム解析を実施した。

2.2 PA I38T耐性変異検出

PA遺伝子のI38T耐性変異のスクリーニング検出には、国立感染症研究所のPAI38T耐性変異検出法実験プロトコール⁹⁾に示されたRNase H2 assay技術を用いて、A/H1N1pdm09ウイルス、A/H3N2ウイルスおよびB型ビクトリア系統についてRNase H-Dependent PCR (rhPCR)を行い、Allelic Discrimination解析によるPA遺伝子のI38T変異の検出を実施した。

結果

1. PA耐性変異検出状況

本県で分離・検出されたA/H1N1pdm09ウイルス（63件）、A/H3N2ウイルス（94件）およびB型ビクトリア系統（48件）、計205件について検体採取月別のPA遺伝子のアミノ酸耐性変異解析の結果を以下に示した（表2）。

表2 バロキサビル耐性変異遺伝子の検出状況

採取月	調査数	インフルエンザ 亜型			PA遺伝子耐性変異 (耐性マーカー)		
		A/H1N1pdm09	A/H3N2	InfB (ビクトリア系統)	A/H1N1pdm09	A/H3N2	InfB (ビクトリア系統)
		2019年	5月	7		2	
	6月	2				2	
	7月	1		1			
	8月	1		1			
	9月	15	10	3		2	
	10月	6	4			2	
	11月	8	8				
	12月	13	10			3	
2020年	1月	11	6	1		4	
	2月	7	2			5	
	3月	2	1			1	
2020年4月 ～ 2022年10月	0	2020年4月～2022年10月はCOVID-19の流行禍の防疫措置等によりインフルエンザ流行抑制					
2022年	11月	1		1			
	12月	5		5			
2023年	1月	7		7			
	2月	4		4			
	3月	4		4			
	4月	8		8			
	5月	3		3			
	6月	6		6			
	7月	7		7			
	8月	5	4	1	1*		
	9月	11	3	8		1**	
	10月	12	2	10			
	11月	8	2	5		1	
	12月	13	1	8		4	
2024年	1月	13	2	5		6	
	2月	8		2		6	
	3月	7	2	1		4	
	4月	3				3	
	5月	0					
	6月	1	1				
	7月	1		1			
	8月	1	1				
	9月	2	2				
	10月	2	2				
	計	205	63	94	48	1	1

※PA遺伝子 I38T変異 2023年8月採取 (A/H1N1pdm)

※PA遺伝子 I38V変異 2023年9月採取 (A/H3N2)

1.1 A/H1N1pdm09インフルエンザウイルス

A/H1N1pdm09ウイルス (63件)のうち、PA (I38T) 耐性変異 (Isoleucine→Threonine) を有するウイルスが1件 (1.6%) 検出された。

なお、本患児から採取された臨床検体を用いてウイルス分離を試みたがA/H1N1pdm09ウイルス株の分離は成功せず、従って薬剤感受性試験⁸⁾による確認検査には至っていない。

1.2 A/H3N2インフルエンザウイルス

A/H3N2ウイルス (94件)のうち、PA (I38V) 耐性変異 (Isoleucine→Valine) を有するウイルスが1件 (1.1%) 検出された。

国立感染症研究所インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センターにて、バロキサビルに対する薬剤感受性試験⁸⁾を実施したところ、本感受性参照株と比較して感受性が低下しており、このA/H3N2ウイルス分離株はバロキサビル耐性株と判定された。

1.3 B型インフルエンザウイルス (ビクトリア系統)

B型ビクトリア系統 (48件) について、PA 遺伝子のアミノ酸配列の解析を行ったが、I38T、I38MあるいはI38F等の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と判定された。

2. PA耐性変異が確認された患者疫学情報

2023年8月に発熱、上気道炎および鼻汁症状を呈した患者（3歳児）からPAI38T耐性変異を有するA/H1N1pdm09ウイルスが検出された。この患児は受診した医療機関において臨床検体を採取する前には抗インフルエンザ薬による治療歴はなかった。しかし、直前にインフルエンザに罹患した近親者がおり、バロキサビルを治療投与されていた事例であった。

2023年9月に発熱および上気道炎症状を呈した患者（3歳児）から、PAI38V耐性変異を有するA/H3N2ウイルスが分離・検出された。この患児は検体採取前には抗インフルエンザ薬の投与はされていない。また、直前に近親者に有症者がいたが医療機関を受診していないため、インフルエンザ罹患の有無と症状等の詳細は不明であった。

考 察

三重県感染症発生動向調査事業において、2019年5月～2024年10月に分離・検出された季節性インフルエンザウイルスのバロキサビル耐性変異検出状況は、A/H1N1pdm09ウイルスは63件中1件（1.6%）、A/H3N2ウイルスは94件中1件（1.1%）から本耐性変異遺伝子が検出された。これらの2例はバロキサビル未投与の患者から検出されたヒトからヒトへの伝播が示唆された事例で、今後の継続的な動向監視が重要である。今回の調査ではB型ビクトリア系統は、バロキサビル耐性変異は検出されていないが、A型インフルエンザウイルスと同様に引き続き、動向把握が必要である。

A/H1N1pdm09ウイルスは、バロキサビル耐性変異の指標⁷⁾であるPA（I38T）耐性変異を有するウイルスであったが、一方で同じく38番目のPA耐性変異が検出されたA/H3N2ウイルスは、前者とは異なるPAアミノ酸が耐性変異（I38V）を獲得していたが、本薬剤感受性試験の結果からバロキサビルに対する感受性が低下していたことが証明された事例であった。このことは、PA遺伝子の単一の変異を検出するI38T変異検出のスクリーニング検査法の実施ではなく、他のPA遺伝子のアミノ酸変異を考慮した塩基配列解析法の実施が必要であると考えられた。また、塩基配列解析が有用であった事例として、奈良県においてPA遺伝子の38番目とは異なる199番目のPA（E199G）変異による事例で、さらに、このバロキサビル耐性変異ウイルス（E199G）は、これまで世界的に確認されていないcommunity clusterからの報告例¹⁰⁾であった。現在のところ、バロキサビル耐性変異ウイルスはヒトからヒトへ限定的な感染伝播が確認¹¹⁾されているが、過去の事例では、薬剤は異なるが北欧を由来とするオセルタミビル耐性ウ

イルス（A/H1N1ウイルス：Aソ連型）が急速に広がり蔓延した。当時、国内の検出割合は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¹²⁾に転じたことから、医療体制への影響等、社会的に懸念される事項となった。また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¹³⁾、あるいは散発事例から家族内感染^{14, 15)}等により、今後、バロキサビル耐性ウイルスにおいてもヒトからヒトへの伝播による感染拡大が憂慮されている。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、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。

近年のバロキサビルの供給量（見込み）は、令和3年度は1.2万人分とCOVID-19の流行禍の防疫措置等によりインフルエンザ流行が抑制され、減少したが令和4年度は136.5万人分、令和5年度は365.7万人分、令和6年度は554万人分^{16, 17)}と年々増加している。この背景から平時より、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、積極的な動向監視を行い、多くの症例解析と、そのデータの蓄積により適正な評価に繋げていくことが重要である。

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。

なお、本研究の一部は、公益財団法人岡三加藤文化振興財団および東海乳酸菌研究会研究助成を受けたものである。

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>) .
(2024.12.6 access) .
- 2) 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.
(2024.12.6 access) .
- 3) 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. (2024.12.6 access) .
- 4) 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. (2024.12.6 access) .
 - 5) Yano T, Ochiai H, Akachi S, Matsumura Y : Polymerase Acidic Subunit I38T Mutant Influenza A(H3N2) Virus Isolated from a Pediatric Patient without Prior Baloxavir Marboxil Treatment in Mie Prefecture (November 2018) *Jpn .Infect.Dis* : **73**(5), 383-385 (2020) .
 - 6) 矢野拓弥, 赤地重宏, 松村義晴 : 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), 三重保環研年報, **21**, (通巻第64号), 29-34 (2019) .
 - 7) 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. (2018) . (2024.12.6 access) .
 - 8) 国立感染症研究所 : インフルエンザ診断マニュアル (第5版) 令和5年8月. <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20230829.pdf> (2024.12.6 access) .
 - 9) 国立感染症研究所 : PAI38T耐性変異検出法実験プロトコール. 2019年9月 Ver.1
 - 10) 高下恵美, 藤崎誠一郎, 森田博子 他 : 奈良県におけるバロキサビル耐性変異インフルエンザウイルスの community cluster, 病原微生物検出情報, **45** , 31-32 (2024) .
 - 11) 高下恵美, 森田博子, 小川理恵 他 : 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, 病原微生物検出情報, **40** , 197-199 (2019) .
 - 12) 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) .
 - 13) 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) .
 - 14) 矢野拓弥 : オセルタミビル投与の小児患者から検出された耐性 A (H1N1) pdm09 ウイルスの検討小児感染免疫, **25**, 289-296 (2013) .
 - 15) 矢野拓弥, 高下恵美, 江島美穂 他 : 家族内感染が疑われたオセルタミビル投与前の小児患者から検出された抗インフルエンザ薬耐性 A (H1N1) pdm09ウイルス, 三重保環研年報, **16** (通巻第59号), 35-41 (2014) .
 - 16) 厚生労働省 : 抗インフルエンザウイルス薬等の安定供給について 令和4年12月15日 <https://www.mhlw.go.jp/content/001027599.pdf> (2024.12.6 access) .
 - 17) 厚生労働省 : 抗インフルエンザウイルス薬等の安定供給について 令和6年11月21日 <https://www.mhlw.go.jp/content/001337068.pdf> (2024.12.6 access) .