

20. 静岡県における抗インフルエンザ薬耐性株の出現状況に関する疫学的解析

○酒井 悠希子（静岡県環境衛生科学研究所）

阿部 冬樹（静岡県環境衛生科学研究所）

【研究目的】

日本は世界のオセルタミビル生産量の 70%以上を臨床現場で使用しているとされている。日本感染症学会の指針¹⁾では、インフルエンザの治療に際し、重症化抑制のため抗インフルエンザ薬の早期投与を推奨しており、抗インフルエンザ薬の全国的な多用は今後も続くと考えられている。

現在国内で臨床使用されている抗インフルエンザ薬はオセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルの4種であり、これらの作用機序はいずれもノイラミニダーゼ（NA）阻害である。2013/2014 シーズンには札幌市においてオセルタミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの地域流行が報告されている²⁾。また、2015/2016 シーズンにはオセルタミビルに耐性を持つ A(H1N1)pdm09 ウイルスが 2565 株中 48 株（1.9%）確認されており³⁾、本県を含め全国的な広がりが懸念される。

出現の可能性が高いオセルタミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスについては、Allele-specific RT-PCR 法による H275Y 変異の検出により、全国の地方衛生研究所で検査を行っている。一方、A(H3N2)および B 型ウイルスについては、従来法は高コストかつ操作が煩雑であるため地方衛生研究所での実施が困難であり、国立感染症研究所において検査を行っている。

そこで、本研究では、Allele-specific RT-PCR 法により、静岡県内で分離された A(H1N1)pdm09 ウイルスのオセルタミビル耐性獲得状況を調べた。また、従来法より迅速かつ簡便に検査できる方法として、新規蛍光基質（BTP3-Neu5Ac）を用いた方法を用いて、A(H1N1)pdm09 以外のウイルスについても4種すべての治療薬に対する耐性の獲得状況を調べることにより、本法の有用性について検討した。

【研究方法】

2015/2016 シーズンから 2016/2017 シーズンにかけて静岡県内の感染症発生動向調査定点医療機関を受診した散発患者および学校集団発生患者から得られた咽頭ぬぐい液等から MDCK 細胞を用いて分離されたインフルエンザウイルスについて、以下の方法により耐性株の検出を試みた。

1 オセルタミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスの検出

当所において分離された A(H1N1)pdm09 ウイルスのうち、2015/2016 シーズンに分離され

た 28 株および 2016/2017 シーズンに分離された 2 株、計 30 株について、Allele-specific RT-PCR 法による H275Y 変異の検出によりオセルタミビルに対する耐性を調べた⁴⁾。分離株の赤血球凝集価 (HA 価) を測定し、8HA 価以上の株については培養上清を低速遠心して細胞由来成分を除去し、滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを検体とし、8HA 価未満のウイルス株の場合は RNA 抽出液を検体とした。Quantitect Virus+ROX Vial kit (QIAGEN) を使用しリアルタイム RT-PCR (ABI7500, Applied Biosystems) を行った。PCR 反応終了後、Allelic Discrimination 解析にて各検体の蛍光強度を測定し、Allelic Discrimination の図上で Y275 陽性コントロールを結んだ線上にプロットされた検体をオセルタミビル耐性、H275 陽性コントロール上にプロットされた検体をオセルタミビル感受性と判定した。

2 新規蛍光基質 (BTP3-Neu5Ac) を用いた耐性株の検出法の検討

BTP3-Neu5Ac には A 型および B 型ウイルスの NA 存在部位に強い蛍光を発する活性が報告されており⁵⁾、本基質を用いたインフルエンザウイルスの耐性株の検出を行った。

MDCK 細胞を 96 穴マイクロプレートに撒き、単層を形成するまで培養後、細胞を PBS で洗浄し、 $5 \mu\text{g/mL}$ アセチルトリプシン加 MEM 培地 $80 \mu\text{L}$ と被検試料 (ウイルス培養液) $20 \mu\text{L}$ を加え、 CO_2 インキュベーターで 34°C 、1 週間培養した。そこに抗インフルエンザ薬 4 種類を、ウェル内の最終薬剤濃度が設定した濃度となるよう添加し、 CO_2 インキュベーターで 37°C 、30 分反応させた。次に基質 (BTP3-Neu5Ac) を最終濃度が $100 \mu\text{M}$ となるよう添加し、 CO_2 インキュベーターで 37°C 、最大 30 分反応させたのち、UV イルミネーター上で 365nm の紫外線を照射し蛍光像を観察した (図 1)。

1) 薬剤濃度等の条件検討

被検試料のウイルス濃度については調整せず、ウイルス培養液をそのまま使用し、新規蛍光基質濃度については一定の濃度 ($100 \mu\text{M}$) で使用した。抗インフルエンザ薬濃度について、各亜型の感受性株を用いて、4 種それぞれについてスクリーニング法で使用するのに最適な濃度を検討した。すなわち、図 1 に示した方法により、最終濃度が 1000、500、100、50、10、5、1 および 0.5nM となるよう添加した。その後、各亜型の耐性株を用いて、設定した条件において蛍光がみられる濃度を確認した。

2) スクリーニング検査

1) で設定した条件下で、2015/2016 シーズンから 2016/2017 シーズンに当所で分離され

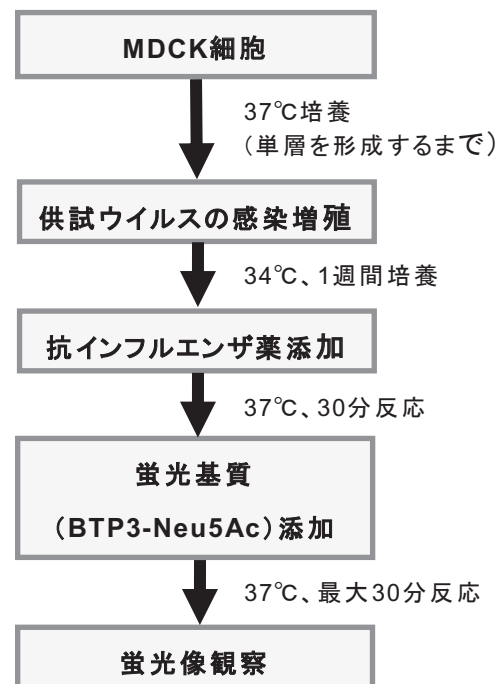


図1 BTP3-Neu5Acを用いた耐性株検出法の手順

た 70 株 (A(H1N1)pdm09 : 28 株、A(H3N2) : 23 株、B 型山形系統 : 9 株、B 型ビクトリア系統 : 10 株) に対するスクリーニング検査を行い、薬剤耐性の有無を確認した (図 2)。

【結果】

1 オセルタミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルスの検出状況

2015/2016 シーズンに分離された 28 株、2016/2017 シーズンに分離された 2 株はいずれもオセルタミビル感受性と判定され、オセルタミビル耐性株は検出されなかった (表 1)。

2 BTP3-Neu5Ac を用いた耐性株のスクリーニング検出状況

上記の条件において各亜型の耐性株に蛍光がみられることを確認した。同条件でスクリーニング検査を行ったところ、2015/2016 シーズンから 2016/2017 シーズンに分離された 70 株 (A(H1N1)pdm09 : 28 株、A(H3N2) : 23 株、B 型山形系統 : 9 株、B 型ビクトリア系統 : 10 株) は、抗インフルエンザ薬 4 種に対していずれも感受性であることが分かった (表 2)。スクリーニング検査においてほとんどの株が判定可能であったが、70 株中 3 株 (4.3%) は判定に苦慮する程度の蛍光が見られたため、確認検査 (4-(methylumbelliferyl)-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) 基質を用いる蛍光法) を実施し、感受性であることを確認した。

【考察と今後の課題】

2015/2016 シーズンから 2016/2017 シーズンにかけて県内で分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス 30 株は、いずれもオセルタミビル感受性であり、オセルタミビル耐性株は検出されず、懸念されていた耐性株の拡大は認められなかった。

オセルタミビル耐性の A(H1N1)pdm09 ウイルス以外の耐性株については Allele-specific RT-PCR 法により検出することができない。そのため他の方法として①ノイラミニダーゼ (NA) の塩基配列を決定し、アミノ酸変異の有無を調べる方法、②MUNANA 基質を用いる蛍光法および化学発光法 (NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit, Applied Biosystems) により薬剤感受性試験を実施し、感受性株の 100 倍以上の IC₅₀ 値 (NA 活性を 50% 阻害する薬剤濃度) を示した株を耐性株と判定する方法がある⁴⁾。これらの方法の欠点として、①検出可能なのは既知の耐性獲得と関連のある変異のみに限定される、②高コストかつ操作が煩雑なため検査件数が限られる等があった。

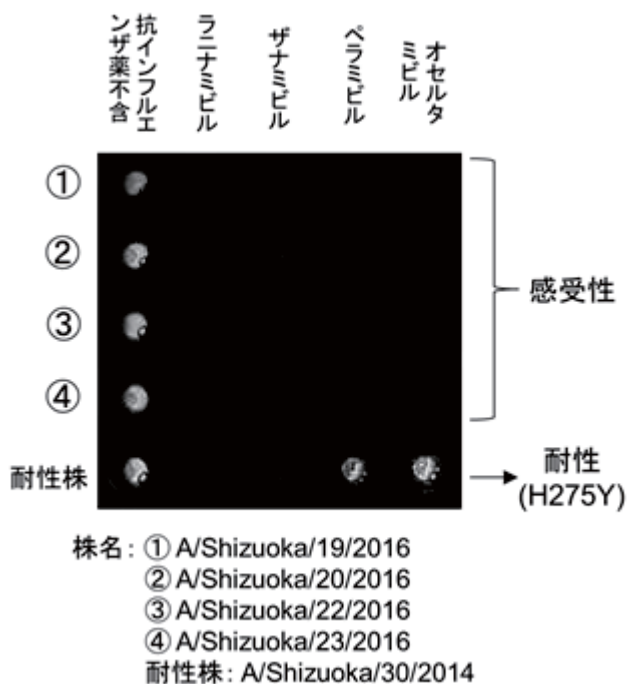


図2 BTP3-Neu5Acを用いたA(H1N1)pdm09株の耐性株スクリーニング検査の蛍光像

そこで、BTP3-Neu5Ac を用いた耐性株の検出法について検討した。本基質には A 型および B 型ウイルスの NA 存在部位に強い蛍光を発する活性が報告されており⁵⁾、A 型および B 型ウイルスの NA と反応すると、蛍光色素である BTP3 が切り離され、そこに 365nm の紫外線を照射すると強い蛍光を発するという特性を利用することにより、耐性株を検出するためのスクリーニング法として利用できると考えた。

スクリーニング検査においてほとんどの株が判定可能であったが、一部の株について判定に苦慮する程度の蛍光が見られたため、確認検査を要した。このような現象が見られた原因として、当該ウイルス株の増殖するスピードが速く、BTP3-Neu5Ac 添加の時点でウイルス濃度が濃くなりすぎたことが考えられる。このように確認検査が必要となる事例は一定数みられると考えられ、今後の課題である。

本法は従来の方法より迅速かつ簡便に耐性株を検出できる点、マイクロプレートを使用することにより一度に多数の検体を検査できる点等において優位性の高い方法であることが分かり、今後の耐性株サーベイランスが飛躍的に充実することが期待される。

本法により、当所での 2015/2016 シーズンから 2016/2017 シーズンの分離株 70 株について、NA 阻害薬 4 種に対する薬剤耐性を調べた。その結果、耐性株は検出されず、静岡県内において耐性株の侵淫はないことが推察された。一方国内では、2016/2017 シーズン（2017 年 6 月 21 日現在）の耐性株が 175 株中 2 株（1.1%）検出されており⁶⁾、耐性株を引き続き調査していく必要がある。耐性株の検出状況は、県内の医療機関に情報提供することにより抗インフルエンザ薬の選定等治療に役立つほか、国立感染症研究所に報告することにより国がビッグデータを持ち、全国的な流行状況を把握するための一助となるので、今後も調査を続けていく。

【参考文献】

- 1) 社団法人日本感染症学会・インフルエンザ委員会：社団法人日本感染症学会提言 2012, 4-5, 平成 24 年 8 月 20 日
- 2) 国立感染症研究所他：インフルエンザ 2013/14 シーズン, 病原微生物検出情報, 35, 1-3 (2014)
- 3) 国立感染症研究所他：2015/2016 シーズンのインフルエンザ分離株の解析, 病原微生物検出情報, 37, 4-9 (2016)
- 4) 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他：インフルエンザ診断マニュアル（第 3 版）, 58-82, 平成 26 年 9 月
- 5) Kurebayashi, Y. et al.: Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells, Sci. Rep. , 4, 4877 (2014)
- 6) 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 2017 年 6 月 21 日, <http://www.niid.go.jp/niid/ja/influ-resist.html>

表1 Allele-specific RT-PCR法を用いたH275Y変異の検出による
オセルタミビルに対する耐性株（A(H1N1)pdm09ウイルス）の検出状況

供試株	感受性株	耐性株	合計
2015/2016シーズン分離株	28	0	28
2016/2017シーズン分離株	2	0	2
計	30	0	30

表2 BTP3-Neu5Acを用いた
抗インフルエンザ薬に対する耐性株のスクリーニング検査結果

	オセルタミビル	ペラミビル	ザナミビル	ラニナミビル
A(H1N1)pdm09	0/28	0/28	0/28	0/28
A(H3N2)	0/23	0/23	0/23	0/23
B型山形系統	0/9	0/9	0/9	0/9
B型ビクトリア系統	0/10	0/10	0/10	0/10
計	0/70	0/70	0/70	0/70

【経費使途明細】

品目	金額(円)
新規蛍光基質（BTP3-Neu5Ac）	10,692
抗インフルエンザ薬4種（オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビル）	127,332
クライオバイアル 2ml	26,460
リザーバー	6,372
ニワトリ、モルモット保存血液	117,612
カット綿	2,808
事務用品	3,216
振込手数料	5,508
合 計	300,000
大同生命厚生事業団助成金	300,000