

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08210

研究課題名（和文）小児における抗インフルエンザ薬低感受性ウイルス出現の監視と制御

研究課題名（英文）Surveillance and control of the emergence of the reduced anti-influenza drug susceptible variant in children

研究代表者

佐藤 晶論（Masatoki, Sato）

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60423795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザA型と診断され、オセルタミビルもしくはバロキサビルで加療を受けた小児を研究対象とした。経時的に鼻腔ぬぐい液を採取し、ウイルス学的解析および臨床経過について解析した。オセルタミビル投与群35例中3例（8.6%）で薬剤低感受性変異株が検出された。バロキサビル投与群38例中12例（31.6%）で、バロキサビル低感受性変異株が検出された。特にH1亜型よりもH3亜型で変異株の検出率が高かった。これら変異株が検出された症例では、感染性ウイルス排泄時間と有症状時間は遷延することが示された。小児ではバロキサビル投与後の変異ウイルス出現に関し今後も監視を続ける必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害薬であるバロキサビルは、その作用機序から既存のノイラミニダーゼ阻害薬と比較し、投与直後のウイルス量を抑制できる。しかし、小児では、A型インフルエンザ、特にA/H3亜型ウイルス感染患者にバロキサビルを投与すると薬剤低感受性変異株が高率に選択されることが示された。このバロキサビル低感受性変異株が検出された症例では非検出例よりも感染性ウイルス排出時間が有意に遷延し、症状改善後も変異ウイルスによる感染伝播の可能性が示された。本研究により、小児インフルエンザ患者に対する抗インフルエンザ薬の選択基準について提案できたことの社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Children diagnosed with influenza A and treated with oseltamivir or baloxavir marboxil (baloxavir) were included in the study. Nasal swabs were collected before and over time after treatment for virologic analysis. Moreover, their clinical symptoms after treatment was recorded trice daily by their parents. The variant with the reduced susceptibility against oseltamivir and baloxavir was detected in 3 of 35 (8.6%) and 12 of 38 (31.6%) children, respectively. No clinical impact was observed in children with the reduced oseltamivir susceptible variant. However, the duration of infectious virus shedding after treatment and the time to clinical symptom improvement was longer in patients with variants with the reduced baloxavir susceptibility than those without these variants. The results in this study suggest that children should be monitored for the emergence of the variant with the reduced baloxavir susceptibility after treatment.

研究分野：小児感染症学

キーワード：インフルエンザ 抗ウイルス薬

1. 研究開始当初の背景

現在、インフルエンザと診断された場合、ノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬またはキャップ依存性エンドヌクレアーゼ (CEN) 阻害薬を用いた抗ウイルス療法を選択することができる。小児では、NA 阻害薬投与後に約 5% の患者から NA 阻害薬に対する感受性が低下した変異株が検出される。一方、CEN 阻害薬を投与された小児の 20 ~ 30% で CEN 阻害薬に感受性が低下した変異株が検出されることが報告されている。しかし、実臨床における CEN 阻害薬低感受性変異株の臨床的な影響については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、NA 阻害薬であるオセルタミビル (以下 OTV) または CEN 阻害薬であるパロキサビル・マルボキシル (以下 BXM) 投与後に変異株が検出される患者背景と変異株の生物学的性状について検討することで、薬剤低感受性変異株の出現要因を究明し、抗インフルエンザ薬の適正な選択と投与方法を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

福島県内の小児科クリニックでインフルエンザと診断され、OTV もしくは BXM で加療される児を対象として、本研究への参加を依頼した。
研究参加への同意が得られた場合、受診当日に患者から鼻腔ぬぐい液を採取した。薬剤投与 3 日後および 5 日後 (該当日が休診日の場合にはその前後の日) にも来院して頂き、同様に鼻腔ぬぐい液を採取した。
患者の情報について収集するアンケート用紙と、受診後の臨床経過について 1 日 3 回評価し記入する経過表を受診当日に配布し、最終受診日に回収した。
以後、下記のようにウイルス学的解析および臨床情報の解析を行った。

1) 経時的なウイルス量の定量とウイルス分離

経時的に採取した鼻腔ぬぐい液検体を材料としてウイルス分離を行った。また、リアルタイム PCR 法で RNA 量を定量し、さらに、組織培養法により感染性ウイルスの力価を定量した。

2) 薬剤感受性試験

分離されたウイルスを材料として、蛍光法もしくは化学発光法によりオセルタミビルに対する感受性試験を行い、さらにパロキサビル投与例から分離されたウイルスを材料として、ウイルス産生抑制試験もしくはフォーカス減少法により薬剤感受性試験を実施した。

3) ウイルス遺伝子解析

患者から採取した鼻腔ぬぐい液と分離ウイルスの双方からウイルス RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、ウイルス遺伝子およびアミノ酸変異を解析した。

4) 患者情報解析

保護者に記入して頂いたアンケート用紙と臨床経過表をもとに、患者背景と臨床経過を解析した。

4. 研究成果

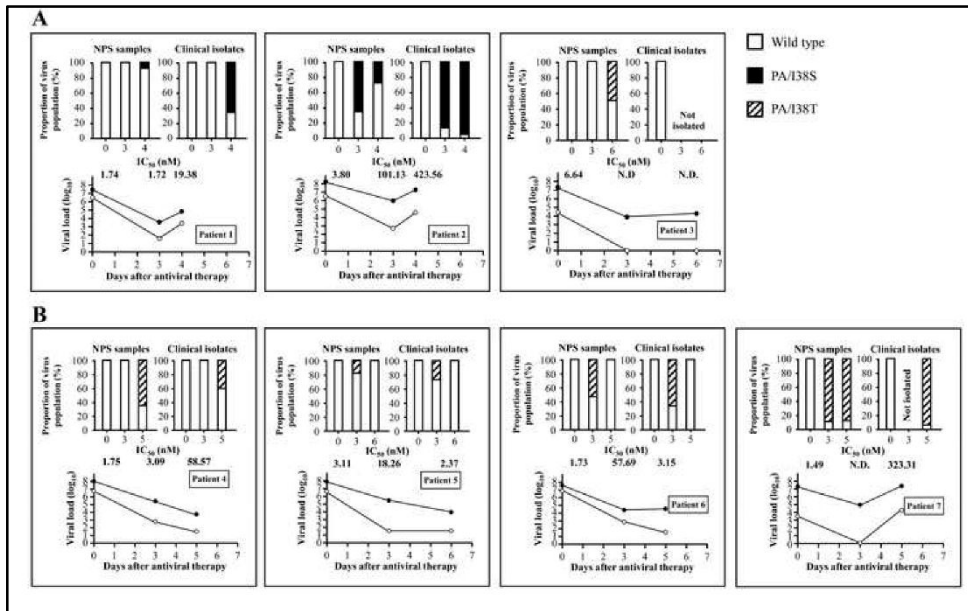
2018/2019 年と 2019/2020 年の合計 2 インフルエンザシーズンにおいて、A 型インフルエンザと診断され OTV を投与された 35 例と BXM を投与された 38 例から薬剤投与前、投与後 2 回、合計 3 回、鼻腔ぬぐい液を採取した。また、薬剤投与後の臨床経過について記載した経過表についても全例から回収した。
OTV 投与群と比較して BXM 投与群では投与翌日のウイルス量は有意に少なかった。
OTV 投与群と BXM 投与群との間に、薬剤投与後の有熱時間に差はなかった。
OTV 投与群 35 例中 3 例 (8.6%) で、薬剤投与後に OTV 低感受性変異株が検出された。
OTV 低感受性変異株検出例と非検出例との間に、有熱時間、有症状時間、ウイルス排泄時間に有意差はなかった。
BXM 投与 38 例中 12 例 (31.6%) で、薬剤投与後に BXM 低感受性変異株が検出された。その詳細については下記の通りであった。
1) BXM 低感受性変異株が検出されたのは、A/H1 亜型感染例で 30 例中 7 例 (23.3%)、A/H3 亜型感染例で 8 例中 5 例 (62.5%) であり、明らかに A/H3 亜型感染例で BXM 低感受性変異株の検出率が高かった。
2) BXM 低感受性変異株が検出された 12 例で、PA 遺伝子解析の結果、PA 上のアミノ酸置換が以下のように確認された：PA/I38T 変異が 8 例、PA/I38S 変異が 2 例、PA/I38F が 1 例、PA/A37T が 1 例 (図 1、2)。
3) BXM 低感受性変異株非検出であった 26 例中 4 例 (15.4%) で薬剤投与後にウイルス量の再増加があった。一方、BXM 低感受性変異株検出例では、12 例中 7 例 (58.3%)

でウイルス量の再増加がみられた。薬剤低感受性変異株はヒトでの増殖能が維持されることが確認された。

- 4) BXM 低感受性変異株が検出された症例のウイルス排泄時間は薬剤投与後 6 日間であった。一方、非検出例のウイルス排泄時間は 3 日間であり、有意に低感受性変異株検出例での感染性ウイルス排泄時間は遷延した。
- 5) 2018/2019 年シーズンにおける BXM 低感受性変異株非検出例と検出例の有症状時間は、それぞれ 35.8 時間と 69.5 時間、2019/2020 年シーズンではそれぞれ 29.5 時間と 75.0 時間と変異株検出例で症状時間は遷延することが示された。

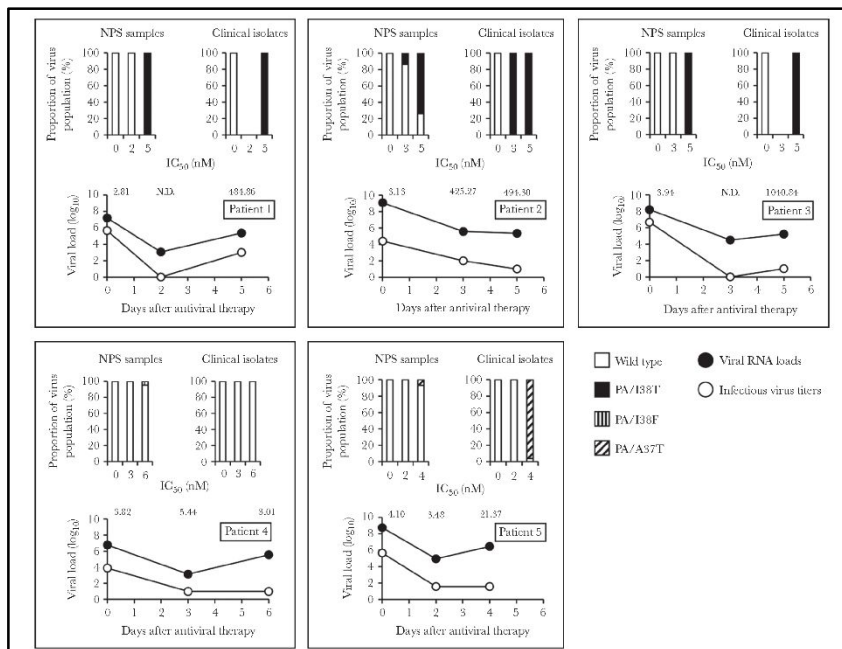
以上の結果から、BXM 低感受性変異株は A/H3 亜型感染例で検出されやすく、変異株が検出されると、ウイルス排泄時間と有症状時間の遷延化に寄与することが示された。また、BXM 低感受性変異株のヒトにおける増殖能は保たれていることから、小児における BXM 投与適応の判断は慎重になされるべきと考えられる。

図 1 2018/2019 シーズンにおけるパロキサビル低感受性変異株検出とウイルス量変化



A パネルは A/H1 亜型ウイルス感染例、B パネルは A/H3 亜型ウイルス感染例を示す。
IC₅₀, 50%阻害濃度 NPS, 鼻腔ぬぐい液、PA, ポリメラーゼ酸性エンドヌクレアーゼ

図 2 2019/2020 シーズンにおけるパロキサビル低感受性変異株検出とウイルス量変化



Patient 1, 2, 4, 5 は A/H1 亜型ウイルス感染例、Patient 3 は A/H3 亜型ウイルス感染例を示す。
IC₅₀, 50%阻害濃度 NPS, 鼻腔ぬぐい液、PA, ポリメラーゼ酸性エンドヌクレアーゼ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Masatoki, Takashita Emi, Katayose Masahiko, Nemoto Kenji, Sakai Nobuko, Fujisaki Seiichiro, Hashimoto Koichi, Hosoya Mitsuaki	4. 巻 224
2. 論文標題 Detection of variants with reduced baloxavir marboxil and oseltamivir susceptibility in children with influenza A during the 2019-2020 influenza season	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1735, 1741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/infdis/jiab196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Masatoki, Takashita Emi, Katayose Masahiko, Nemoto Kenji, Sakai Nobuko, Hashimoto Koichi, Hosoya Mitsuaki	4. 巻 222
2. 論文標題 Detection of variants with reduced baloxavir marboxil susceptibility after treatment of children with influenza A during the 2018-2019 influenza season	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 121 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/infdis/jiaa061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 晶論
2. 発表標題 小児におけるパロキサビルの効果と課題
3. 学会等名 第53回日本小児感染症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 晶論、片寄 雅彦、根本 健二、酒井 信子、橋本 浩一、細矢 光亮
2. 発表標題 パロキサビル投与小児インフルエンザA型症例における薬剤低感受性ウイルスの検出
3. 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究の成果は日本小児科学会からの「2022/23 シーズンのインフルエンザ治療・予防指針（2022年9月19日）」、日本感染症学会からの「キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害薬 バロキサビル マルボキシル（ゾフルーザ）の使用についての新たな提言（2023.3.24）」中に引用されている。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	橋本 浩一 (Hashimoto Koichi) (50322342)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	
研究分担者	細矢 光亮 (Hosoya Mitsuaki) (80192318)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------