

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10444

研究課題名（和文）パロキサビル耐性インフルエンザウイルスの出現頻度と分子疫学に関する研究

研究課題名（英文）Molecular epidemiology and emergence frequency of baloxavir-resistant influenza virus.

研究代表者

廣井 聡 (Hiroi, Satoshi)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員

研究者番号：40455548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：当所に搬入された検体を用いてインフルエンザウイルスAH1亜型、AH3亜型、B型のPA遺伝子を解析したが、パロキサビル耐性変異株は検出されなかった。新型コロナウイルス感染症の影響で感染者数が激減し本研究では十分な数を解析できなかった。また、新型コロナウイルスの変異株の検出を行い、分離したD614G変異株、アルファ株、デルタ株、オミクロン株に対するワクチン誘導抗体の中和能を解析した。その結果、2回接種ではD614G変異株およびアルファ株、3回接種ではオミクロン株BA.1およびBA.2に対する幾何平均抗体価が相対的に高く、複数回のワクチン接種によって抗体の親和性が高まることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染症の流行によりインフルエンザの感染者数が大幅に減少し、本研究ではサンプル数が限定的であったが、パロキサビル耐性となる変異を持つインフルエンザウイルスは検出されなかった。今後はまたインフルエンザが流行すると考えられることから、薬剤耐性インフルエンザウイルスの継続的な監視は公衆衛生上重要である。新型コロナウイルスは変異株が次々に出現し、流行すると医学的にも社会的にも影響が大きいことから、今後も新たな変異株の出現を監視し続ける必要がある。また、新たな変異株に対する抗体保有状況を解析することは、感染拡大防止の観点から意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The PA gene of influenza viruses AH1, AH3, and B were analyzed, but baloxavir-resistant variants were not detected in this study. Surveillance of drug-resistant influenza virus is important for public health, but a sufficient number of samples could not be analyzed due to the spread of COVID-19.

The SARS-CoV-2 variants, D614G mutant, alpha, delta, and omicron strains, were detected and isolated during the study period, and microneutralization tests were performed to assess vaccine-induced neutralizing antibodies against the variants. The results showed relatively high geometric mean antibody titres against the D614G strain and alpha variant after a second dose of vaccination and against omicron BA.1 and BA.2 after the third dose of vaccination. Therefore, it is likely that the second dose of vaccination induced neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 strains and the third dose of vaccination enhanced the reactivity of neutralizing antibodies to the variants.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス コロナウイルス 変異株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2017/2018 インフルエンザシーズン末から、新たに抗インフルエンザウイルス薬としてキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤であるパロキサビルが加わった。しかし、パロキサビルへの感受性が低下する耐性変異株 (PA 遺伝子 I38T 変異ウイルス) の出現が問題となった。その出現頻度はノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤耐性インフルエンザウイルスよりも高いとされるが、パロキサビルは単回経口投与であることから NA 阻害剤より服用しやすいというメリットがあり、使用割合が増えると、耐性ウイルスの検出も増える可能性が考えられた。しかし、2020 年に入り新型コロナウイルス感染症の感染者が国内で確認されるとインフルエンザの流行は収束し、その後 2022-2023 シーズンまでインフルエンザの流行は認められなかった。一方で新型コロナウイルス感染症はその間に第 8 波までの流行があり、特に第 4 波以降は抗原性や感染性の異なる変異株の出現が大きな影響を及ぼした。

2. 研究の目的

これまでインフルエンザウイルスには、オセルタミビルを中心としたノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬が主に使用されてきたが、2018/2019 シーズンはパロキサビルの使用割合が増加し、薬剤感受性が低下する耐性変異ウイルス (PA 遺伝子 I38T 変異ウイルス) の出現が報告された。そこで本研究では、当所に搬入された検体を用いてインフルエンザウイルス PA 遺伝子の塩基配列解析を行い、耐性変異ウイルスの出現頻度および性状を解析して公衆衛生に寄与する事を目的とした。また、結果的に研究期間中はインフルエンザの流行が限定的であったことから、その間に流行した新型コロナウイルスについても性状を明らかにするために、変異株の検出やその分離株を用いた解析を行った。

3. 研究の方法

病原体サーベイランスで当所に搬入された検体のうち、インフルエンザ陽性となった検体またはその分離株から核酸を抽出し、インフルエンザウイルス PA 遺伝子の部分領域の塩基配列を決定して、パロキサビルへの感受性が低下する耐性変異株を検索した。

新型コロナウイルスについては搬入された検体から抽出した核酸を用いて、スパイク領域の塩基配列解析およびスクリーニング解析 (N501Y および L452R 変異) により変異株を検索し、その検出割合を調べた。また、検体から VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いて各変異株のウイルス分離を試み、分離したウイルス株を使って中和試験を行った。中和試験には、BNT162b2 新型コロナウイルス mRNA ワクチン (ファイザー社) を 2 回接種し 3 週間以上経過してから採取された被験者の血液サンプルの残余血清を同意を得て使用し、各変異株に対するワクチン誘導中和抗体の力価を測定した。また、同ワクチンを 3 回接種し 3 週間以上経った被験者から同意を得て血液サンプルを採取し、さらに、ワクチン接種後の抗体価の推移を調べるために、3 回目を接種してから半年後にも血液サンプルを採取して中和試験を行った。

4. 研究成果

1) インフルエンザウイルスの遺伝子解析

2019/2020 シーズンは AH1 亜型が流行の中心であったが、2020 年に入ってから新型コロナウイルス感染症の影響で例年より流行規模が小さく、収束も早かった。2020/2021 シーズンは流行がみとめられず、2021/2022 シーズンも流行はなかったがシーズン末に AH3 亜型が 1 例検出された。2022/2023 シーズンは 3 年ぶりにインフルエンザが流行し、AH3 亜型が中心の流行であった。しかしコロナ前と比べると流行規模は小さかった。

各シーズンの合計で最終的に AH1 亜型 59 検体、AH3 亜型 29 検体、B 型 24 検体からインフルエンザウイルスの PA 遺伝子の塩基配列を解析したが、所期の目標検体数よりはるかに少なく、結果、パロキサビルへの感受性が低下する耐性変異株は検出されなかった(表 1)。インフルエンザの患者数が大きく減少し、抗インフルエンザウイルス薬が使用される機会も少なかったと考えられる。

シーズン	解析株数			変異株数
	AH1	AH3	B	
2019/2020	59	2	24	0
2020/2021	0	0	0	0
2021/2022	0	1	0	0
2022/2023	0	26	0	0

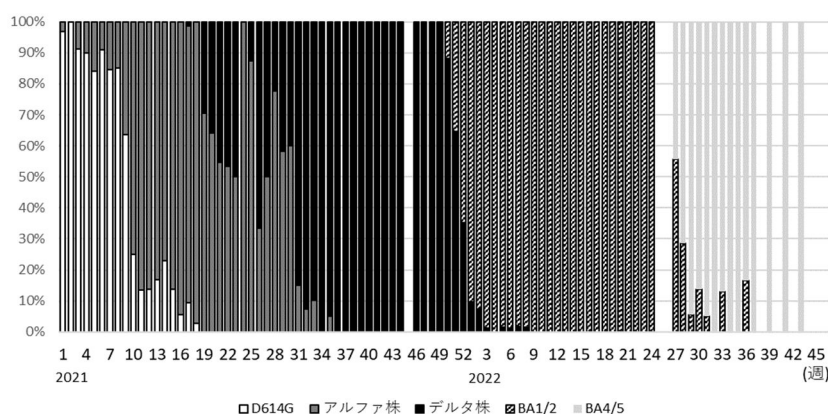
表 1. インフルエンザ PA 遺伝子の解析株数

2) 新型コロナウイルス変異株の検出

スパイクタンパクをコードする遺伝子領域の塩基配列解析により、2020 年度は D614G 変異株の

検出が確認された。また、塩基配列解析およびスクリーニング解析の結果、2021年度の第4波において流行の中心となったウイルス株は、最初に英国で報告されたアルファ株(B.1.1.7)で、当所で解析したサンプルでは、2021年の1月初旬に初めて確認され、5月初旬には完全にアルファ株に置き換わった。第5波はインドで最初に報告されたデルタ株(B.1.617.2)が中心で、当所では4月末に1例目が検出され、8月中旬にはすべてデルタ株に置き換わった。第6波は南アフリカで最初に報告されたオミクロン株(B.1.1.529)が中心で、当所では12月中旬に最初のオミクロン株が検出され、2022年の2月下旬にはデルタ株が検出されなくなった。2021年度末からはオミクロン株 BA.1 および BA.2 が中心に検出されたが、2022年の7月初旬に最初のオミクロン株 BA.4/5 が検出され、その後その割合が徐々に上昇して、第7波および第8波は BA.5 系統のウイルスが中心であった。第7波の中で9月初旬には BA.1 および BA.2 は検出されなくなった。以上のことから、これまで確認された変異株の中で、感染力がより強いとされるオミクロン株では、アルファ株やデルタ株よりも短い期間で新しい変異株に置き換わることが確認された(図1)。

図1. 新型コロナウイルス変異株の検出割合(2021-2022)



3) 新型コロナウイルスの分離

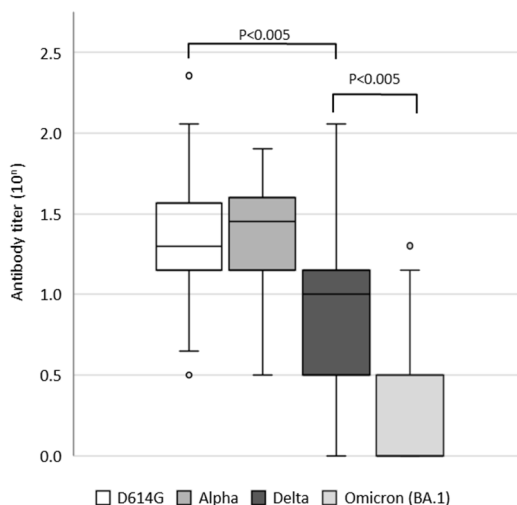
臨床検体から VeroE6/TMPRSS2 細胞を用いてウイルス分離を試みた結果、検体のリアルタイム RT-PCR の Ct 値が 30 を超えると分離が困難であった。最終的に研究期間中に日本国内で検出された各変異株が当所でも分離され、以下のウイルス株を以降の解析に用いた。

- D614G 変異株 (hCoV-19/Japan/01PH16/2020)
- アルファ株 (hCoV-19/Japan/01PH18/2021)
- デルタ株 (hCoV-19/Japan/01PH30/2021)
- オミクロン株 BA.1 (hCoV-19/Japan/01PH39/2021)
- オミクロン株 BA.2 (hCoV-19/Japan/01PH2/2022)
- オミクロン株 BA.5 系統 (BF.1、hCoV-19/Japan/01PH4/2022)

4) ワクチン誘導中和抗体の解析

分離した新型コロナウイルス変異株に対するワクチン誘導抗体の中和能を調べるために、2回のワクチンを接種した32名と、その中で3回目のワクチンを接種し採血の同意を得た10名の血清サンプルを用いて microneutralization 法(血清希釈倍率10倍から1280倍)による中和試験を行った。その結果、ワクチンを2回接種した被験者の D614G 変異株、アルファ株、デルタ株、オミクロン株 BA.1 に対する幾何平均抗体価は 19.5、21.8、6.3、2.0 であった。ワクチン接種によりすべての被験者が中和抗体を保有していることが確認されたが、D614G 変異株およびアルファ株と比べてデルタ株、オミクロン BA.1 に対する幾何平均抗体価は有意に低かった(図2)。特にオミクロン株 BA.1 の幾何平均抗体価がデルタ株と比較しても有意に低かったこと

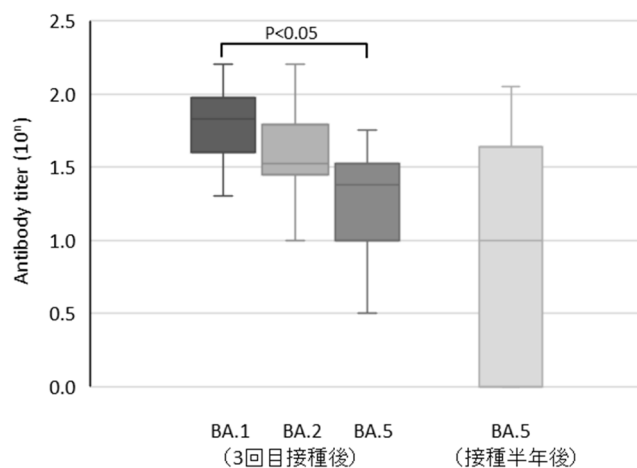
図2. ワクチン2回接種者(n=32)の幾何平均抗体価



から、その抗原性の変化が大きく影響したと考えられる。本研究では被験者数が限られていることもあり、年齢や性別と中和抗体価との相関は認められなかった。ワクチン3回接種者の血清については、オミクロン株 BA.1 に対する幾何平均中和抗体価(62.8)が2回接種後の BA.1 に対する幾何平均抗体価(2.0)よりも有意に上昇していた($P<0.005$)。BA.2 および BA.5 に対する幾何平均抗体価は38.6および19.1で、両変異株に対しても中和能は認められたが、BA.5 に対する幾何平均抗体価は BA.1 と比較して有意に低かった(図3)。以上の結果から、オミクロン株のスパイク領域の変異によって、ワクチン接種により誘導された抗体の中和能は低下するものの、3回目を接種することでオミクロン株に対する中和抗体価は2回目接種後と比較して大きく上昇することが確認された。

次に、3回目接種後の抗体価を測定した被験者から、接種半年後にも血液サンプルを採取し、オミクロン株 BA.5 に対する中和抗体価を測定した。その結果、半年後の幾何平均抗体価は9.0で、3回目接種後と比べて有意な差はなかったが、抗体価が上昇あるいは高いまま維持されている被験者(7例)と、抗体価が下がり10倍以下となった被験者(3例)とに二分された(図3)。これは、接種半年後の採血時期が2022年夏の第7波の最中となり、一部の被験者はウイルスに暴露される機会があったと考えられる一方で、機会がなかった被験者は接種後半年で抗体価が低下したと考えられる。

図3. ワクチン3回接種者(n=10)の幾何平均抗体価



5) まとめ

薬剤耐性のインフルエンザウイルスは本研究では検出されなかったが、新型コロナウイルス感染症が拡大した影響で十分な解析、検討を行うことはできなかった。薬剤耐性ウイルスの解析はウイルス学的だけでなく公衆衛生上も重要な課題であり、今後はコロナ前のように毎冬にインフルエンザの流行が起こる可能性が高いことから引き続き監視を続ける必要がある。また、新型コロナウイルスの流行がインフルエンザの減少につながったことは、コロナウイルスに対する感染防止対策がインフルエンザをはじめ各種呼吸器ウイルスによる感染症にも有用であることを示している。

新型コロナウイルスは当所でも世界および日本で感染が広がった変異株が検出された。Wuhan-Hu-1株のスパイクタンパクをコードする1価の新型コロナウイルスワクチンでも抗原性の異なるオミクロン株に対して抗体価が上昇したことから、複数回接種することにより抗体の親和性が向上することが確認された。また、3回目のワクチン接種から時間が経っても抗体価が維持または上がっている被験者が確認されたことから、今後はウイルスへの暴露や感染による抗体保有者が増加していくと考えられる。ワクチンや感染により上昇した抗体価は、時間の経過とともに低下することが報告されているため、流行を予測するには、市中流行株に対する集団の抗体保有率を毎年継続的に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hiroi Satoshi, Morikawa Saeko, Motomura Kazushi, Mori Haruyo	4. 巻 5
2. 論文標題 Vaccine-induced neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 Omicron variant isolated in Osaka, Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Access Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/acmi.0.000465.v3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	森川 佐依子 (Morikawa Saeko) (40321939)	地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主幹研究員 (84407)	

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