

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590145

研究課題名(和文) 新型インフルエンザウイルスの薬剤耐性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of drug resistance mechanism against influenza virus

研究代表者

田川 優子(坂井優子)(Tagawa, Yuko)

東京大学・医科学研究所・助手

研究者番号：40178538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：新型インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)に感染し、抗インフルエンザ薬治療を受けた数百人の患者の臨床検体中のウイルス量とウイルス遺伝子中の耐性変異を調べた。ノイラミニダーゼ阻害薬はH1N1pdmに対してH3N2やB型よりもウイルス排出が良好であるが、10～30%に耐性変異が出現することがわかった。また、免疫を抑制するステロイド治療を受けたH1N1pdm感染小児ではウイルス排出期間が延び、出現した耐性ウイルスも長期に残存した。

研究成果の概要(英文)：In clinical specimens from hundreds of patients who infected with Influenza virus (A/H1N1pdm) and received anti-influenza drug therapy, quantifying the virus and analyzing the nucleotide sequences of the drug-resistant mutant viruses were carried out. It was succeeded to show that neuraminidase inhibitor was more effective to viral shedding of H1N1pdm than that of H3N2 or B-type, but resistance mutation was observed in 10-30%. In addition, the steroid treatment for immunosuppression resulted in the viral shedding period was longer and emerging the drug-resistant virus was also remain in the long period in the case of the H1N1pdm-infected children.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ 薬剤耐性 新型インフルエンザ 抗インフルエンザ薬 ノイラミニダーゼ阻害薬 小児ぜんそく ステロイド剤

## 1. 研究開始当初の背景

2009年春メキシコで発生した豚インフルエンザは瞬く間に世界中に広がり、新型インフルエンザパンデミックとなった。一時はWHOがフェーズ5を宣言し、感染率が小児と若年成人で高く、致死率は0.5%未満とはいえ、基礎疾患、肥満、妊婦の入院または死亡リスクが高かったことより、世界中を震撼させた。我々はいち早く発生直後のウイルスの性状解析及び病原性の確認を行い、8月にはNature. 460(7258):1021-5, 2009で報告した。

この新型インフルエンザA/H1N1pdmの治療には、ノイラミニダーゼ(NA)阻害薬であるオセルタミビルおよびザナミビルが推奨されている。このウイルスは両薬剤に感受性であるが、NAに特徴的なアミノ酸置換をもつオセルタミビル耐性株が散発的に検出されている。2008/2009シーズンに季節性Aソ連型(H1N1)インフルエンザでオセルタミビル耐性ウイルスが一挙に全国に広がったという経緯があり、また、M2阻害薬であるアマンタジンおよびリマンタジンに対しては季節性のみならず、高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1に至るまで耐性を獲得してしまっている。今後、A/H1N1pdmウイルスがオセルタミビル耐性を獲得しないように厳重に監視していく必要がある。

A/H1N1pdmの小児重症例には喘息様呼吸器症状が数多く発生し、アレルギーの関与が示唆されステロイド剤による治療が有効であったとの報告がある。ステロイド剤は過剰な免疫応答を落ち着かせる働きがあるが、インフルエンザ感染時に免疫が抑制された状態ではウイルスが増殖しやすくなる可能性がある。わずかに生じた薬剤耐性変異ウイルスは免疫によってすぐさま駆逐されてしまうところが、免疫抑制状態では変異ウイルスが増殖できる可能性を与えてしまう。

また、ステロイド剤のみではなく他の免疫抑制剤や各種対症療法薬剤、また、年々開発される新規抗ウイルス剤など、さまざまな条件における薬剤耐性については常に監視し、詳細な薬剤耐性機構の解明を行う必要がある。

## 2. 研究の目的

2009年パンデミックを起こした新型インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm)は、今後も流行を続けていくと考えられる。現在、多くの抗インフルエンザ薬が開発され、治療にも効果的であったが、多用によりウイルスが薬剤耐性を獲得することは必然である。病原性変化や耐性ウイルス出現への警戒など、今後も様々な対応が必要である。

そこで、多くの感染患者の臨床検体を集積し、検体中のウイルスを直接解析することによって、患者体内でわずかに発生している耐性変異を探索する方法を用いて、耐性変異を検出し、その経時変化や病原性変化などを解

析し、薬剤耐性機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体の収集

2009年には大阪府の新型インフルエンザ発生初期の感染患者91検体、横須賀市のぜんそく症状で入院した小児18人から継時的に採取した82検体、2011年には横浜市、横須賀市、栃木市、東京都の病院の小児入院患者の抗ウイルス薬投与前後の141人298検体、2012年は横浜市、横須賀市の小児入院患者の抗ウイルス剤投与前後の139人306検体、2013年は東京都成人12検体の咽頭ぬぐい液、気管吸引液を収集した。臨床症状や抗ウイルス薬の投与状況について等の情報を医師から提供された。なお、各病院においてまたは東京大学医科学研究所において、倫理審査を申請し承認されている。

### (2) 検体中ウイルスの解析

患者体内における耐性変異の出現頻度は低く、その存在比は低い可能性があり、分離したウイルスでは選択的に耐性変異が排除されてしまう可能性がある。そこで、検体から直接ウイルスRNAを抽出し、RT-PCRを行い、そのPCR産物をクローニングした後、複数のクローンの塩基配列を解析することによって、存在比の低い耐性変異を検出した。

また、継時的に採取した検体のウイルス力価を測定して、体内におけるウイルス残存の様子を調べた。

### (3) ウイルス分離

ウイルス力価の測定と同時にMDCK細胞またはAX-4細胞を用いて、検体からウイルスを分離し、病原性等ウイルスの性状解析のために、ストックウイルス液を作製した。

分離したウイルスのRNAから逆転写した後、各遺伝子特異的プライマーを使用してPCRを行い、遺伝子の塩基配列を決定し、検体から直接解析したものと比較した。

分離したウイルスは、さまざまな細胞におけるウイルス増殖能や薬剤に対する感受性、レセプター特異性などの解析を行った。

### (4) 迅速診断キットの検定

2013、2015年時点において我が国で販売されていた数十種類の迅速診断キットについて、サブタイプや年代、クレードの異なるインフルエンザウイルスを希釈し、どこまで検出可能か否かを比較検討した。

### (5) サブタイプ判別法の改良

多くの臨床検体を解析するためにはサブタイプを迅速に簡便に判別する必要がある。また、迅速診断キットでA型と判定されても遺伝子解析のプライマー設定のためにはサブタイプの判別が必要である。多くの検体を

わずかな検体量で判別するためのリアルタイム RT-PCR の方法を改良した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大阪市発生初期の患者検体

2009 年日本において大阪の高校生を中心に新型インフルエンザが蔓延した時の検体について、ウイルス分離を行ったところ、91 検体中 70 検体からウイルスが分離された。塩基配列解析の結果、2019 年夏ごろからクレードの違うウイルスが流行していることが判明したが、薬剤投与後の検体ではないため耐性変異を持つウイルスは検出されなかった。

##### (2) ステロイドの投与による影響

横須賀市で新型インフルエンザに感染し、喘息様症状を起こして入院した小児 18 人に対し、ステロイドによる治療が行われた症例について、継時的に咽頭ぬぐい液を採取し、検体中のウイルスの残存期間や耐性ウイルスの有無を調べた。薬剤の投与前後にウイルスの分離が成功した 11 人のうち、ステロイド投与例は 6 名で非投与例の 5 名と比較した。検体中のウイルス力価の測定より、最終的にウイルスが分離できた投与後日数を比較したところ、ステロイド投与群では 4 から 6 日までウイルスが残存していたが、非投与群ではおおむね 3, 4 日まででウイルスは検出できなくなっていた。検体中のウイルスを直接 RT-PCR を行ったクローンの NA 遺伝子を確認したところ、投与群、非投与群ともに 1 例の耐性変異が検出された。ステロイド非投与の例では 4 日目に NA275 番目のアミノ酸に耐性変異が見られたが 6 日目には検出されなかった。しかし、ステロイド投与の例では 6 日以降に耐性変異が出現し、8 日目でも耐性変異が検出された。従って、ステロイドの投与によって、ウイルスの残存期間が延び、耐性変異ウイルスも長期に残存することがわかった。

##### (3) ウイルスサブタイプと抗ウイルス剤

2010/11 シーズンは 141 人 298 検体の内、H1N1pdm が 46 人、H3N2 が 56 人 B 型が 20 人で 19 人が陰性であった。治療に使用された薬剤の内訳はタミフル 33%、イナビル 24%、ラピアクタ 40%であった。検体中のウイルス力価を測定した結果、H1N1pdm に対してラピアクタやイナビルはタミフル同様に高いウイルス効果を示し、4 日目には多くがウイルスが消失することがわかったが、H3N2 ではいずれの薬剤も H1N1pdm に比較して 4 日以降にウイルスが生存していることがわかった。B 型に対してはイナビルの症例のみであるが、H3N2 同様に 4 日以降でもウイルス力価が高く残存していた。しかし、解熱までの日数はイナビルが効果的であることがわかった。

塩基配列解析の結果 H1N1pdm の患者の内タ

ミフルでは 31%にラピアクタでは 13%に耐性変異が検出された。これらの耐性変異の薬剤感受性を調べたところ、いずれもタミフルとラピアクタに耐性を獲得していることがわかった。

##### (4) 混合感染

2011/12 シーズンでは 139 人 306 検体の内、H1N1pdm は 2 人だけで H3N2 と B 型は 50%ずつであった。なお、検体中のサブタイプを調べることによって、そのうち 3 人では H3N2 と B 型に混合して感染していることが判明した。

##### (5) 迅速診断キット

新型インフルエンザ A(H1N1pdm)発生時及び中国において H7N9 のヒト感染例が発生した時に、その時に購入可能であった迅速診断キットについてそれぞれ二十数種類について、季節性ウイルス、H5N1、H1N1pdm、H7N9 他様々なインフルエンザウイルスが迅速診断キットで検出可能か試験した。キットによっては 100 倍程度の感度の違いがあるが、すべてのキットで A 型または B 型のウイルスは検出可能であった。

##### (6) サブタイプ判別法の改良

検体から効率よくサブタイプを検出系するために迅速診断キットに使用した検体溶解液を G25 カラムにて抽出した RNA を直接、リアルタイム RT-PCR を行うことを可能にした。なお、サブタイプはリアルタイム RT-PCR のプローブの検出色素を変えることによって、1 反応系で 2 つのサブタイプを別々に検出できることを証明した。検出感度は 1 PFU のウイルスがあれば良いことも示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

以下すべて査読有

1. Zhao D, Fukuyama S, Sakai-Tagawa Y, Takashita E, Shoemaker JE, Kawaoka Y. C646, a Novel p300/CREB-Binding Protein-Specific Inhibitor of Histone Acetyltransferase, Attenuates Influenza A Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec 28;60(3):1902-6. doi:10.1128/AAC.02055-15.
2. Yamaji R, Yamada S, Le MQ, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y. Mammalian Adaptive Mutations of the PA Protein of Highly Pathogenic Avian H5N1 Influenza Virus. *J Virol.* 2015 Apr 15;89(8):4117-25. doi:10.1128/JVI.03532-14.

3. Yamaji R, Yamada S, Le MQ, Li C, Chen H, Qurnianingsih E, Nidom CA, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y. Identification of PB2 mutations responsible for the efficient replication of H5N1 influenza viruses in human lung epithelial cells. *J Virol*. 2015 Jan 21. 89(7):3947-56. doi: 10.1128/JVI.03328-14.
4. Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, Kiso M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Katsura H, Nonaka N, Fujii H, Fujii K, Sugita Y, Noda T, Goto H, Fukuyama S, Watanabe S, Neumann G, Oyama M, Kitano H, Kawaoka Y. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe*. 2014 Dec 10;16(6):795-805. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.002.
5. Sakai-Tagawa Y, Ozawa M, Yamada S, Uchida Y, Saito T, Takahashi K, Sugaya N, Tashiro M, Kawaoka Y. Detection sensitivity of influenza rapid diagnostic tests. *Microbiol Immunol*. 2014 Oct;58(10):600-6. doi: 10.1111/1348-0421.12185.
6. Muramoto Y, Shoemaker JE, Le MQ, Itoh Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Imai H, Uraki R, Takano R, Kawakami E, Ito M, Okamoto K, Ishigaki H, Mimuro H, Sasakawa C, Matsuoka Y, Noda T, Fukuyama S, Ogasawara K, Kitano H, Kawaoka Y. Disease Severity Is Associated with Differential Gene Expression at the Early and Late Phases of Infection in Nonhuman Primates Infected with Different H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *J Virol*. 2014 Aug;88(16):8981-97. doi: 10.1128/JVI.00907-14.
7. Sugaya N, Sakai-Tagawa Y, Bamba M, Yasuhara R, Yamazaki M, Kawakami C, Yamaguchi Y, Ide Y, Ichikawa M, Mitamura K, Kawaoka Y. Comparison between virus shedding and fever duration after treating children with pandemic A H1N1/09 and children with A H3N2 with a neuraminidase inhibitor. *Antivir Ther*. 2015;20(1):49-55. 16. doi: 10.3851/IMP2798.
8. Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Takeshi Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao Dongming, Kishida N, Shirakura M, Robert P de Vries, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, J Einfeld A, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher E A, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson J C, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 2013; 501 ; 551-555 doi: 10.1038/nature12392.
9. Kawai Y, Kimura Y, Lezhava A, Kanamori H, Usui K, Hanami T, Soma T, Morlighem JÉ, Saga S, Ishizu Y, Aoki S, Endo R, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, Mitani Y, Ishidao T, Kawakami C, Kurata H, Furuya Y, Saito T, Okazaki N, Chikahira M, Hayashi E, Tsuruoka S, Toguchi T, Saito Y, Ban T, Izumi S, Uryu H, Kudo K, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y, Hirai A, Hayashizaki Y, Ishikawa T. One-step detection of the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus by the RT-SmartAmp assay and its clinical validation. *PLoS One*. 2012;7(1):e30236. doi:10.1371/journal.pone.0018956
10. Morlighem JÉ, Aoki S, Kishima M, Hanami M, Ogawa C, Jalloh A, Takahashi Y, Kawai Y, Saga S, Hayashi E, Ban T, Izumi S, Wada A, Mano M, Fukunaga M, Kijima Y, Shiomi M, Inoue K, Hata T, Koretsune Y, Kudo K, Himeno Y, Hirai A, Takahashi K, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Hayashizaki Y, Ishikawa T. Mutation analysis of 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses collected in Japan during the peak phase of the pandemic. *PLoS One*. 2011 Apr 29;6(4):e18956. doi:10.1371/journal.pone.0018956.
11. Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Tamura D, Kiso M, Kawakami E, Hatakeyama S, Ebihara Y, Koibuchi T, Fujii T, Takahashi K, Shimojima M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Sakabe S, Iwasa A, Takahashi K, Ishii T, Gorai T, Tsuji K, Iwamoto A, Kawaoka Y. Sero-prevalence of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza A Virus among

Schoolchildren and Their Parents in  
Tokyo, Japan. Clin Vaccine Immunol.  
2011 Feb 23.  
Doi:10.1128/CVI.00428-10

〔学会発表〕(計 7件)

1. 村本裕紀子「高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスに感染したカニクイザルの宿主応答」第 157 回日本獣医医学学会学術集会 2014.9.11 北海道大学(札幌)
2. 山地玲奈「H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの適応に關与するアミノ酸変異の同定」第 62 回日本ウイルス学会 2014.11.11 パシフィコ横浜(横浜)
3. 村本祐紀子「高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスに感染したカニクイザルの宿主応答」第 62 回日本ウイルス学会 2014.11.12 パシフィコ横浜(横浜)
4. 坂井(田川)優子「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルスは迅速診断キットで判定可能か？」第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013.11.11 神戸国際会議場(神戸)
5. 伊藤睦美「2010 年から 2011 年に西日本で鳥から分離された H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスのマウスにおける病原性の比較」
6. 坂井(田川)優子「2010/11 シーズン小児臨床検体中の薬剤耐性インフルエンザウイルスの探索」第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012.11.13 大阪国際会議場(大阪)
7. 岩附研子「Sero-prevalence of Pandemic(H1N1)2009 Influenza A Virus among schoolchildren and their parents in Tokyo, Japan.」第 59 回日本ウイルス学会、国際微生物連合 2011 会議合同開催 2011.9.15 札幌コンベンションセンター(札幌)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/virology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井(田川)優子(SAKAI-TAGAWA YUKO)

東京大学・医科学研究所・助手

研究者番号: 40178538