

## A型インフルエンザウイルスにおける

### バロキサビル マルボキシル耐性遺伝子変異検出法の検討及び臨床検体への応用

熊谷 遼太<sup>a</sup>, 長島 真美<sup>a</sup>, 根岸 あかね<sup>a</sup>, 河上 麻美代<sup>a</sup>, 北村 有里恵<sup>a</sup>, 加来 英美子<sup>a</sup>, 浅倉 弘幸<sup>a</sup>, 永野 美由紀<sup>a</sup>, 矢尾板 優<sup>a</sup>, 長谷川 道弥<sup>a</sup>, 林 志直<sup>a</sup>, 平田 俊吉<sup>b</sup>, 藤田 仁<sup>b</sup>, 正木 忠明<sup>b</sup>, 小柳 英樹<sup>b</sup>, 橋本 倫太郎<sup>b</sup>, 加藤 隆司<sup>b</sup>, 牧田 郁夫<sup>b</sup>, 沼口 俊介<sup>b</sup>, 和田 紀之<sup>b</sup>, 松永 貞一<sup>b</sup>, 千葉 友幸<sup>b</sup>, 星野 誠<sup>b</sup>, 鈴木 洋<sup>b</sup>, 清水 伸泰<sup>b</sup>, 林 泉彦<sup>b</sup>, 加地 はるみ<sup>b</sup>, 五十嵐 弥生<sup>b</sup>, 宮田 章子<sup>b</sup>, 黒澤 サト子<sup>b</sup>, 松岡 典子<sup>b</sup>, 三浦 麻子<sup>b</sup>, 鈴木 昌和<sup>b</sup>, 深堀 俊彦<sup>b</sup>, 城所 功文<sup>b</sup>, 佐藤 和子<sup>b</sup>, 北條 稔<sup>b</sup>, 古畑 正<sup>b</sup>, 塩崎 正英<sup>b</sup>, 加茂 隆<sup>b</sup>, 天木 聡<sup>b</sup>, 川邊 敏之<sup>b</sup>, 山上 恵一<sup>b</sup>, 片平 潤一<sup>b</sup>, 田中 光彦<sup>b</sup>, 成田 雅弘<sup>b</sup>, 柏田 和子<sup>b</sup>, 山口 規夫<sup>b</sup>, 新開 敬行<sup>c</sup>, 千葉 隆司<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>d</sup>

2018年3月新規抗インフルエンザ薬としてバロキサビル マルボキシル (バロキサビル) の発売が開始された。バロキサビルは、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤であり、単回経口投与で治療が完結することから注目されている。一方で、A型インフルエンザウイルスにおいて、本剤への薬剤耐性ウイルス (PA I38T 等) が報告され、全国で薬剤耐性株のサーベイランスが実施されている。

本研究では、Real-time PCR 法 (Real-time RT-PCR Allelic Discrimination 法) を用いたバロキサビル耐性変異 (I38T 変異) の検出系を構築し、感染症発生动向調査事業等 (2018年4月~2019年3月) により当センターに搬入されたA型インフルエンザ患者咽頭ぬぐい検体を対象に、バロキサビル耐性変異遺伝子の探索を行った。その結果、A/H3N2 亜型が検出された検体 283 件中 2 件 (0.71%)、A/H1N1pdm09 亜型 185 件中 1 件 (0.54%) から I38T 耐性変異遺伝子が検出された。

**キーワード:** バロキサビル マルボキシル, キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤, 薬剤耐性変異 I38T, 薬剤耐性サーベイランス, インフルエンザウイルス, リアルタイムPCR

#### はじめに

インフルエンザウイルスは、A, B, C, D 型の 4 つの型に分類され、A 型インフルエンザウイルスは、膜タンパク質であるヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) の組み合わせにより、さらに多くの亜型に分類されている。近年の日本における流行は主に A/H3N2 亜型, A/H1N1pdm09 亜型並びに B 型インフルエンザウイルスであり、冬季を中心に季節性インフルエンザとして流行が繰り返されている。

2017/2018シーズンまでのインフルエンザウイルスの治療薬は、M2イオンチャネル阻害剤 (アマンタジン, リマニタジン) およびNA阻害剤 (オセルタミビル, ザナミビル, ラニナミビル, ペラミビル), RNAポリメラーゼ阻害剤 (ファビピラビル) の3種類であったが<sup>1,2)</sup>, 2018年3月, 新規抗インフルエンザ薬としてバロキサビル マルボキシル (以下, バロキサビル) が発売された。バロキサビルは、キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害によりウイルスの増殖を抑制するという新しい作用機序の抗インフルエンザ薬であり、単回経口投与で治療が完結することから注目され、2018/2019シーズンに多く処方された<sup>3)</sup>。一方

で、バロキサビルは、第Ⅲ相臨床試験からウイルスのPA遺伝子に薬剤耐性変異 (PA I38T, I38M, I38F) が報告されており<sup>4)</sup>, 国立感染症研究所および全国地方衛生研究所においても、バロキサビルを含む薬剤耐性インフルエンザウイルスサーベイランスで耐性変異株が報告されている<sup>5)</sup>。また、高下らは、バロキサビル未投与患者例から分離されたウイルスで耐性変異株を報告し<sup>6)</sup>, 薬剤投与患者からの感染伝播の可能性を示唆している。したがって、バロキサビル耐性変異株の流行状況の把握は、東京都におけるインフルエンザ対策の重要な課題であるが、今まで効果的な検査法はなかった。

今回、我々はA型インフルエンザウイルスに対するバロキサビル耐性変異 (I38T) 検出法を開発し、感染症発生动向調査等で搬入された検体を対象に解析を行ったので、その概要を報告する。

#### 実験方法

##### 1. 供試材料

2018年4月から2019年3月までに感染症発生动向調査ならびにクラスター調査事業において、搬入された咽頭ぬぐい

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都感染症発生动向調査事業インフルエンザ病原体定点医療機関

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

<sup>d</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

検体で遺伝子検査<sup>7)</sup>によりA型インフルエンザウイルスが検出された468件 (A/H3N2亜型: 283件, A/H1N1pdm09亜型: 185件) を対象とした。

## 2. 供試材料からのRNA抽出

咽頭ぬぐい液140 µLからQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行い, RNA抽出液60 µLを作製した。

## 3. Real-time PCR法用標準DNAの作成

Real-time PCR法用の標準DNAとして, PAタンパク質をコードする遺伝子領域に設定したプライマーおよびプローブの塩基配列を含む合成DNAを作製した (シグマ・アルドリッチジャパンに合成依頼)。凍結乾燥品をTE溶液で溶解後, 10段階希釈を行い,  $3.0 \times 10^2$  copies/µLから $3.0 \times 10^4$  copies/µLまでの10段階希釈系列を作製した。

## 4. Real-time PCR法 (Real-time RT-PCR Allelic Discrimination法)

長島ら<sup>8,9)</sup>およびNakauchiら<sup>10)</sup>のオセルタミビル耐性変異 (H275Y) 検出法の報告を参考に, PAタンパク質をコードする遺伝子領域の薬剤耐性変異 (I38T) 部位を検出するプライマーおよびTaqMan MGB プローブを設定し, 検出に用いた (Table 1)。プライマーおよびプローブの設定には, Primer Express v.3.0.1 (サーモフィッシャー) を用いた。

標的遺伝子の検出は以下の手順で行った。RNA抽出液 (または標準DNA液) 5 µL, 各プライマー100 µM 0.25 µL, 各プローブ10 µM 0.25 µL およびQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を使用し (最終反応量 25 µL), 50°C 40分, 95°C 15分反応させた後, 94°C 15秒, 60°C (A/H1N1pdm09 亜型: 63°C) 1分15秒のサイクルを45回繰り返した。なお検出機器としてQuantiStudio 12K Flex Real-time PCR System (サーモフィッシャー) を使用し, Genotyping モードで検査を行った。すなわち, Real-time PCR 反応の前後に蛍光強度の測定を行い, FAM を X 軸に,

VIC を Y 軸にそれぞれの蛍光強度差をプロットし, X 軸側にプロットされるものを薬剤耐性変異なし, Y 軸側にプロットされるものを薬剤耐性変異ありと判定した。薬剤耐性変異を含む可能性があるとして判定された検体については, RT-nested-PCR 法及びダイレクトシーケンシング法により塩基配列の確認を行った。

## 5. RT-nested-PCR法

PAタンパク質をコードする遺伝子領域の薬剤耐性変異を含む365 bpを増幅するプライマーを設定し, 検出に用いた (Table 1)。標的遺伝子の増幅は以下の手順で行った。RNA抽出液5 µLを用い, 1stRT-PCRはQIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を使用し (最終反応量25 µL), 56°C30秒, 50°C40分, 95°C15分反応させた後, 94°C30秒, 55°C30秒, 72°C40秒のサイクル35回繰り返した。1stRT-PCR産物5.0 µLを用い, TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を使用し, 2ndPCRとして94°C3分反応させた後, 94°C1分, 55°C2分, 72°C2分のサイクルを30回繰り返した。

## 6. ダイレクトシーケンシング法

PCR 反応産物を電気泳動し, 特異バンドを切り出した後, QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて遺伝子精製を行い, DNA液30 µLを得た。シーケンシング反応には, 2ndPCR プライマーおよびPA領域特異的なプライマー (Table 1) を用い Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (サーモフィッシャー) 試薬を使用し, DNA液5.0 µLを混合し, 94°C15秒, 50°C15秒, 60°C4分のサイクルを25回繰り返した。

シーケンシング反応産物はCentri-Sep Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用い, ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (サーモフィッシャー) を用いて塩基配列を決定した。

## 7. 病原体定点医療機関へのアンケート調査

感染症発生动向調査事業インフルエンザ病原体定点37医療機関 (小児科定点: 22か所, 内科定点: 15か所) を対象

Table 1. Primer Pairs and Fluorlogenetic Probes used for Conventional PCR and Real-time PCR

Type/Subtype	Name	Primer / Probe *	Sequence (5'-3')	Position**	
A	Conventional PCR	A-PA-F1	1st/2nd PCR Fp, Sp	CAA YCC RAT gAT YgT CgA AC	27-46
		A-PA-R1	1st PCR Rp	TYT CYT CgT CRA gRg TgT Ag	480-499
		A-PA-R2	2nd PCR Rp, Sp	AAT ATA TgT ggA CTT CTC TCC	371-391
		A-PA-G	Sp	TgC ATT Tgg RTC RYC ARR TTC	190-210
A/H3N2	Real-time PCR	H3PA-I38T-F1	Fp	CgA ACT TgC AgA AAA AgC AAT g	42-63
		H3PA-I38T-R1	Rp	TgT TCA TTg ATg AAA Tgg AAA TCT g	146-170
		H3PA-I38-1P	I38I Probe	FAM- TgC AgC AAT ATg CAC T -MGB	105-120
		H3PA-T38-1P	I38T Probe	VIC- CAg CAA CAT gCA CTC -MGB	107-121
A/H1N1pdm09	Real-time PCR	pdmPA-I38T-F1	Fp	ggA AAA ggC AAT gAA AgA ATA Tgg	51-74
		pdmPA-I38T-R1	Rp	AAT gAA ATg gAA ATC CgA ATA CAT g	138-162
		pdmPA-I38-1P	I38I Probe	FAM- TgC TgC AAT TTg CAC AC -MGB	105-121
		pdmPA-T38-1P	I38T Probe	VIC- TgC TgC AAC TTg CAC A -MGB	105-120

\* ) Fp:Forward primer, Rp:Reverse primer, Sp:Sequencing primer \*\* ) Reference Sequence: Accession number in GISAID A, A/H3N2: EPI1443574, A/H1N1pdm09: EPI11373382

としアンケート調査を実施した。

アンケートは、①インフルエンザ診断時における抗インフルエンザ薬（オセルタミビル、ザナミビル、バロキサビル、ラニナミビル、ペラミビル、その他）の処方割合について、②バロキサビルが効かない、または効きにくいといった症例経験の有無およびそれらの症例数について、調査を行った。

## 結果及び考察

### 1. Real-time PCR法を用いた薬剤耐性変異の検出系の検討 (A/H3N2亜型およびA/H1N1pdm09亜型)

反応前後に蛍光強度の測定を行い、FAMをX軸に、VICをY軸にそれぞれの蛍光強度差をプロットすると、感受性の標準DNA (I38I) はX軸に沿うよう位置し、耐性変異アミノ酸 (I38T) はY軸に沿うように位置し、蛍光強度の差をプロットすることで薬剤耐性変異の有無を判定することができた (Fig. 1)。また、I38T及びI38Iの混在 (I38I/T mix) についてもX軸、Y軸の間にプロットされることが確認された。このことから、本検出系はI38T変異を明確に判別でき、スクリーニング検査に有用であることが考えられた。

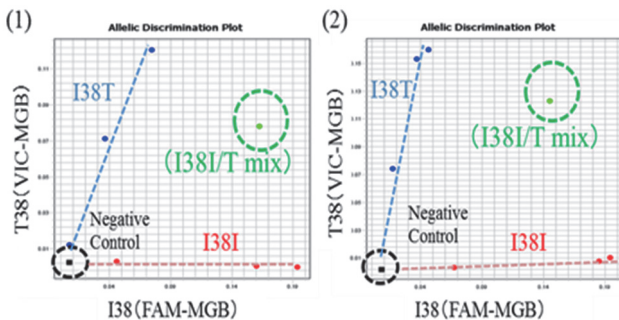


Fig. 1. Results of Real-time RT-PCR Allelic Discrimination-based drug resistance genotyping

- (1) Influenza A/H3N2 Viruses : A FAM-MGB-labeled probe was used to detect I38-alleles ; VIC-MGB-labeled probe was used to detect T38-alleles.
- (2) Influenza A/H1N1pdm09 Viruses : A FAM-MGB-labeled probe was used to detect I38-alleles ; VIC-MGB-labeled probe was used to detect T38-alleles.

## 2. 薬剤耐性変異の検出

### 1) A/H3N2亜型インフルエンザウイルス

A/H3N2亜型が検出された咽頭ぬぐい検体283件についてReal-time PCR法を用いて、薬剤耐性変異の有無を判定した。その結果、283件のうち3件は薬剤耐性変異を含むと考えられ、塩基配列の確認を行ったところ、1件はI38Tが検出されず、2件はI38Tが検出され、2件のうち1件はI38I/T mixであり、1件はI38Tであった (Fig. 2)。これらの結果から、A/H3N2亜型検体283件のうち、I38I : 281件

(99.3%)、I38T : 2件 (0.71%) が検出された。国立感染症研究所によるバロキサビル薬剤耐性サーベイランス

(2019年11月12日現在) においては、I38TおよびI38I/T mixが357件中34件 (9.5%) 検出されている<sup>5)</sup>。

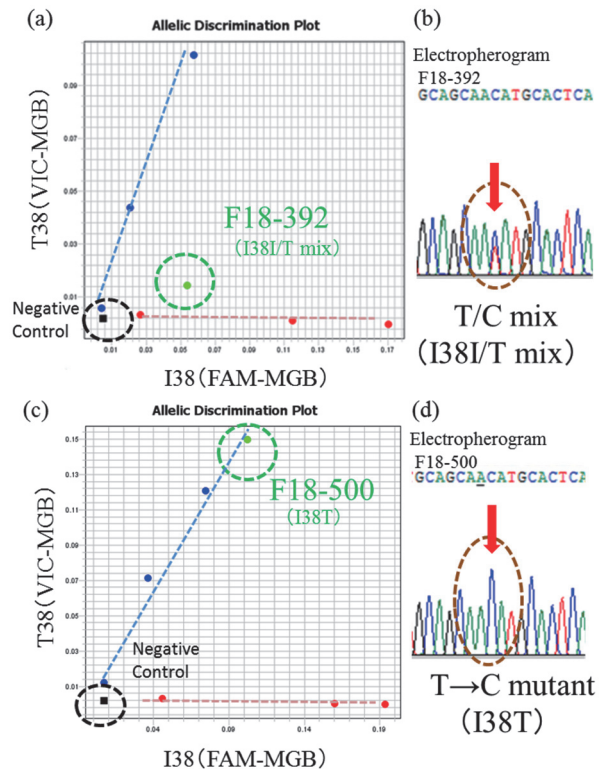


Fig. 2. Results of Real-time RT-PCR Allelic Discrimination-based drug resistance genotyping using A/H3N2 viruses.

- (a), (c) : A FAM-MGB-labeled probe was used to detect I38-alleles ; VIC-MGB-labeled probe was used to detect T38-alleles.
- (b), (d) : DNA sequence electropherogram of I38T(T113C) variants in the PA gene. The SNP change is indicated by an arrow. (b) F18-392 ; PA 113T Homozygous (wild) genotype change to Heterozygous genotype T/C mix. (d) F18-500 ; PA 113T Homozygous (wild) genotype change to Heterozygous genotype C.

### 2) A/H1N1pdm09亜型インフルエンザウイルス

A/H1N1pdm09亜型が検出された咽頭ぬぐい検体185件についてReal-time PCR法を用いて、薬剤耐性変異の有無を判定した。その結果、185件のうち1件は薬剤耐性変異を含むと考えられ、塩基配列の確認を行ったところ、I38I/T mixであった (Fig. 3)。これらの結果から、A/H1N1pdm09亜型検体185件のうち、I38I : 184件 (99.5%)、I38T : 1件 (0.54%) が検出された。国立感染症研究所によるバロキサビル薬剤耐性サーベイランス (2019年11月12日現在) においては、I38TおよびI38I/T mixは343件中6件 (1.7%) 検出されており<sup>5)</sup>、全国と都において大きな差異は確認されなかった。

## 3. アンケート調査結果

病原体定点医療機関を対象としたアンケート調査を実施

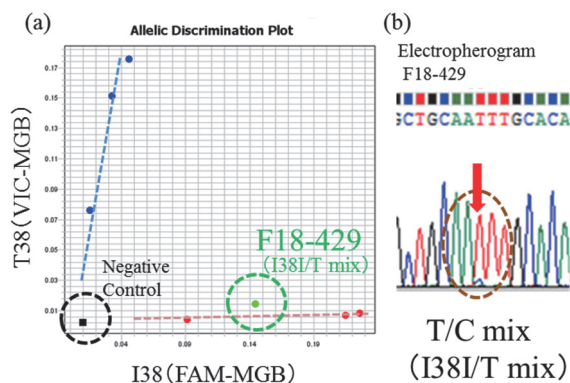


Fig. 3. (a) Result of Real-time RT-PCR Allelic Discrimination-based drug resistance genotyping using A/H1N1pdm09 viruses. A FAM-MGB-labeled probe was used to detect I38-alleles; VIC-MGB-labeled probe was used to detect T38-alleles. (b) DNA sequence electropherogram of I38T(T113C) variants in the PA gene. The SNP change is indicated by an arrow. F18-429: PA 113T Homozygous (wild) genotype change to Heterozygous genotype T/C mix.

した結果、37医療機関中25医療機関（小児：21か所，成人：24か所）から回答があった（回収率：67.6%）。

小児および成人に対しバロキサビルを使用している医療機関は、それぞれ61.9%、58.3%と同程度であった（Fig. 4）。小児においてはオセルタミビルを中心とした治療が行われ、バロキサビルの処方割合はザナミビルと同程度であり、少ない傾向にあった。バロキサビルは、ラニナミビルと同様に単回投与で治療が完結するが、薬剤耐性化や副作用についてエビデンスに乏しい。これらを考慮し、小児へのバロキサビルの処方を控える医療機関が多いことが考えられた。一方、成人においてはラニナミビルを中心とした治療が行われ、次いでオセルタミビルの処方割合が高い傾向にあった。また、バロキサビルはザナミビルと同程度であったが、小児と比較しバロキサビルに切り替えている医療機関が多く見られた。成人に対しては、用法や投与経路等の利便性を重視し処方薬の判断を行っていると考えられ、今後、単回経口投与であるバロキサビルの処方の増加が考えられた。

バロキサビルが効かない、または、効きにくいといった症例については、回答のあった25医療機関において7症例（成人1名、中学生1名、7歳男児1名、5歳男児1名、不明3名）報告された。うち7歳男児の症例の検体は、当センターに搬入され、A/H1N1pdm09亜型でI38I/T mixが検出された検体（F18-429）である。

#### 4. I38T薬剤耐性変異ウイルス

A/H3N2亜型において、I38T（F18-500）、I38I/T mix（F18-392）が検出された2件はそれぞれ86歳、96歳の高齢者女性であった。F18-500はバロキサビル未投与患者であり、近親者等にインフルエンザ患者は確認されなかった。

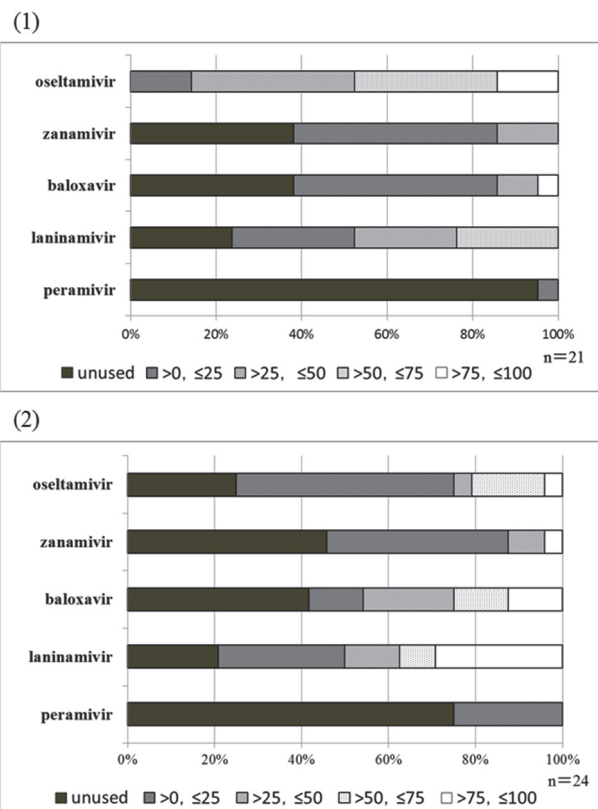


Fig. 4. Frequency of anti-influenza virus drugs (oseltamivir, zanamivir, baloxavir, laninamivir, peramivir) prescription rate.

Raito was calculated based on the number of answers about prescription for children (1) and for adults (2).

A/H1N1pdm09亜型において、I38I/T mixが検出された検体（F18-429）は、バロキサビル投与4日後に7歳男児から採取された検体であり、バロキサビル耐性の獲得と薬剤投与の関係が示唆された。日本ならびに米国で行われている薬剤耐性サーベイランスにおいて、バロキサビル発売以前の株でPA I38Tは検出されておらず、I38T変異は、バロキサビルによる影響を受けているとされる<sup>11)</sup>。今回I38Tが検出された3件についても、バロキサビル投与による直接的な影響や投与患者からの感染伝播によるものと考えられた。

厚生労働省の調査（2018.10-2019.3）では、卸売り業者から医療機関への納入数はバロキサビルが39.3%と最も多く、オセルタミビル（後発品を含む）33.9%、ラニナミビル20.0%と続いており、バロキサビルは2018/2019シーズン最も多く処方されたことが考えられる<sup>3)</sup>。今後もバロキサビルは多くの患者へ処方されることが予想され、バロキサビル耐性インフルエンザウイルスの流行状況を把握していくことは急務である。

今回、我々はReal-time PCR法を用いた耐性変異検出法を開発した。本検査法を用いることで、都内のインフルエンザウイルス流行期に耐性変異ウイルスの迅速な検出が可能となると考えられる。

## ま と め

A型インフルエンザウイルス (A/H3N2亜型および A/H1N1pdm09亜型) におけるパロキサビル耐性変異 (PA I38T) の検出系を開発した. 本検出系を用いて, 感染症発生動向調査事業で搬入されたインフルエンザ患者咽頭ぬぐい検体468件を調査したところ, A/H3N2亜型283件中2件 (0.71%), A/H1N1pdm09亜型185件中1件 (0.54%) から PA I38Tアミノ酸変異が検出された.

## 付 記

以下, 東京都感染症発生動向調査事業インフルエンザ病原体定点医療機関名及び医師名 (敬称略)

平田循環器・内科 平田俊吉, 藤田医院 藤田 仁, 正木医院 正木忠明, どうどうクリニック 小柳英樹, 橋本小児科医院 橋本倫太郎, かとうクリニック 加藤隆司, 牧田小児科内科医院 牧田郁夫, 沼口小児科医院 沼口俊介, 和田小児科医院 和田紀之, 永寿堂医院 松永貞一, 千葉クリニック 千葉友幸, 星野小児科内科クリニック 星野 誠, 鈴木こどもクリニック 鈴木 洋, こどもクリニックしみず 清水伸泰, はやしクリニック 林 泉彦, 加地医院 加地はるみ, 野上医院 五十嵐 弥生, さいわいこどもクリニック 宮田章子, くろさわ子ども&内科クリニック 黒澤サト子, まつおか小児クリニック 松岡典子, ぼれぼれクリニック 三浦麻子, 鈴木小児科内科医院 鈴木昌和, 武こどもクリニック 深堀俊彦, 城所医院 城所功文, さとう内科クリニック 佐藤和子, 北條医院 北條 稔, 古畑病院 古畑 正, しおぎ内科 塩崎正英, 富士見丘医院 加茂 隆, 天木診療所 天木 聡, 川邊内科 川邊敏之, 恵仁堂医院 山上恵一, 片平医院 片平潤一, 京王八王子駅前診療所 田中光彦, 成田クリニック 成田雅弘, 柏田内科クリニック 柏田和子, 山口内科・呼吸器科クリニック 山口規夫

## 文 献

- 1) Hussain, M. Galvin H.D. Haw, T.Y., *et al.*: *Infect Drug Resist*, **10**, 121-134, 2017.
- 2) Li, T.C. Chan, M.C. Lee, N., *et al.*: *Viruses*, **7**, 4929-4944, 2015.
- 3) 厚生労働省, 関連法令・通知・事務連絡: 通常流通用抗インフルエンザ薬の供給状況 (10月分~3月分)
- 4) Omoto, S. Speranzini, V. Hashimoto, T., *et al.*: *Sci Rep* **8**: 9633, 2018.
- 5) 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, 2018/2019シーズン, 抗インフルエンザ薬耐性検出情報 [A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B], <http://www.nih.go.jp/niid/ja/influ-resist.html> (2019年11月12日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) 高下恵美 他: 病原微生物検出情報, **40**, 67-69, 2019.
- 7) 貞升健志, 新開敬行, 長島真美, 他: 化学生物総合管理, **4**, 4-16, 2008.
- 8) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他: 東京健安研七 年 報, **61**, 121-126, 2010.
- 9) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他: 東京健安研七 年 報, **62**, 57-63, 2011.
- 10) Nakauchi, M. Ujiile, M. Obuhi, M., *et al.*: *J Med Virol*, **83**(7), 1121-7, 2011.
- 11) Gubareva, L.V. Mishin, V.P. Patel, M.C., *et al.*: *Euro Surveill*, **24**: pii=1800666, 2019.

**Detection of Baloxavir Marboxil Resistance Gene Mutation in Influenza A Viruses in Tokyo**

Ryota KUMAGAI<sup>a</sup>, Mami NAGASHIMA<sup>a</sup>, Akane NEGISHI<sup>a</sup>, Mamiyo KAWAKAMI<sup>a</sup>, Yurie KITAMURA<sup>a</sup>, Emiko KAKU<sup>a</sup>, Hiroyuki ASAKURA<sup>a</sup>, Miyuki NAGANO<sup>a</sup>, Yuu YAOITA<sup>a</sup>, Michiya HASEGAWA<sup>a</sup>, Yukinao HAYASHI<sup>a</sup>, Shunkichi HIRATA<sup>b</sup>, Hitoshi FUJITA<sup>b</sup>, Tadaaki MASAKI<sup>c</sup>, Hideki KOYANAGI<sup>c</sup>, Rintaro HASHIMOTO<sup>c</sup>, Takashi KATO<sup>c</sup>, Ikuo MAKITA<sup>c</sup>, Shunsuke NUMAGUCHI<sup>b</sup>, Noriyuki WADA<sup>b</sup>, Teiichi MATSUNAGA<sup>b</sup>, Tomoyuki CHIBA<sup>b</sup>, Makoto HOSHINO<sup>b</sup>, Yoh SUZUKI<sup>b</sup>, Nobuyasu SHIMIZU<sup>b</sup>, Motohiko HAYASHI<sup>b</sup>, Harumi KAJI<sup>b</sup>, Yayoi IGARASHI<sup>b</sup>, Akiko MIYATA<sup>b</sup>, Satoko KUROSAWA<sup>b</sup>, Noriko MATSUOKA<sup>b</sup>, Asako MIURA<sup>b</sup>, Masakazu SUZUKI<sup>b</sup>, Toshihiko FUKAHORI<sup>b</sup>, Isafumi KIDOKORO<sup>b</sup>, Kazuko SATO<sup>b</sup>, Minoru HOJHOU<sup>b</sup>, Tadashi FURUHATA<sup>b</sup>, Masahide SHIOZAKI<sup>b</sup>, Takashi KAMO<sup>b</sup>, Satoshi AMAKI<sup>b</sup>, Toshiyuki KAWABE<sup>b</sup>, Keiichi YAMAGAMI<sup>b</sup>, Junichi KATAHIRA<sup>b</sup>, Mitsuhiko TANAKA<sup>b</sup>, Masahiro NARITA<sup>b</sup>, Kazuko KASHIWADA<sup>b</sup>, Norio YAMAGUCHI<sup>b</sup>, Takayuki SHINKAI<sup>a</sup>, Takashi CHIBA<sup>a</sup>, and Kenji SADAMASU<sup>a</sup>

Baloxavir marboxil was released in March 2018. This drug has a novel mechanism of action; specifically, being cap-dependent endonuclease inhibitor. Following its release, it has attracted attention because it requires a single oral dose for the treatment of influenza virus infections. However, influenza viruses with the PA I38T substitution are known to be associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. This has led to the strengthening of anti-influenza virus drug resistance surveillance in Japan.

In this study, we developed a Real-time PCR assay (Real-time RT-PCR Discrimination assay) to identify influenza A viruses with the PA I38T substitution. Using this assay, we tested 468 specimens collected from patients with influenza A viruses in Tokyo, from April 2018 to March 2019. We found that 2 out of the 283 A/H3N2 samples and one out of the 185 A/H1N1pdm09 samples were detected PA I38T substitution.

**Keywords:** Baloxavir Marboxil, cap-dependent endonuclease inhibitor, drug resistance mutations, I38T drug resistance surveillance, influenza virus, Real-time PCR

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>b</sup> Tokyo Metropolitan Influenza sentinel sites for laboratory-based surveillance medical facilities