

## 53. タミフルおよびアマンタジン耐性インフルエンザウイルスの発生状況調査（2007/08～08/09）

今西 芳貴（奈良県保健環境研究センター）

### はじめに

1998年、我が国では抗A型インフルエンザ薬としてアマンタジンが認可された。更に、2001年にはノイラミニダーゼ阻害薬（ザナミビル、オセルタミビル）が追加され、新たな抗インフルエンザ医療体制が構築される時代に入った。この様な状況のなか、2003年から04年にかけて中国・香港でアマンタジン耐性A香港型（A/H3N2）ウイルス（31位のセリンからアスパラギンへの置換）が高頻度に発生していたことをBright<sup>1)</sup>らが初めて公表した。その後、アメリカ、カナダ、オーストラリアおよび我が国を含む東アジアなどの環太平洋地域で広く蔓延していることが明らかとなっている。一方、2007年11月、ノイラミニダーゼ（NA）蛋白の275位のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換しオセルタミビルに対し耐性能を獲得したAソ連型（A/H1N1）インフルエンザウイルスの北欧諸国を中心とする高頻度の流行が報告された。それらの耐性ウイルスはアマンタジン耐性ウイルスと同様に、翌シーズン（2008/09）には我が国を含む北半球諸国へと拡大していった。

本調査では2007/08年から08/09年シーズンの、奈良県における抗薬剤耐性ウイルス（オセルタミビルおよびアマンタジン）の流行状況を、変異部位および変異様式を標的とし調査を行ったので概要を報告する。

### 材料と方法

#### 薬剤耐性ウイルス株の実態調査

##### ）検索対象

2007年11月から2009年3月の間に“奈良県感染症発生動向調査”の定点医療機関で採取された、咽頭ぬぐい液およびうがい液から分離・同定されたA型インフルエンザウイルス81株（（2007/08シーズン：香港型1株、ソ連型34株）（2008/09シーズン：香港型14株、ソ連型32株））を解析対象とした。尚、解析を行ったウイルスは、MDCK細胞によるウイルス分離が成立したものは香港型11株、ソ連型54株で残りは臨床材料から直接遺伝子増幅を行い解析した。

##### ）ウイルスRNA抽出およびcDNA合成

ウイルスRNAの抽出はMDCK細胞上清10μlから、また咽頭ぬぐい液およびうがい液からの直接抽出は300μlからQuickGene SPキット（フジフイルム、東京）を用い、プロトコールに従い抽出した。逆転写反応はReverTra Ace（TOYOBO、大阪）を用い反応

させた。

) 標的遺伝子領域 RT-PCR およびシーケンス

オセルタミビル耐性検索は、国立感染症研究所が提示した NA 遺伝子標的プライマー (N1-F671-693, N1-R1079-1057) を用い、また、アマンタジン耐性検索は M2 遺伝子標的プライマー (M2-For3、M2-Rev) を用い PCR<sup>2)</sup>反応を実施した。遺伝子配列判読は ThermoSequenase Cy5,5 Dye Terminator Cycle sequencing キットを用い添付のプロトコールに従って実施した。

) ゲノム解析 (BLAST)

遺伝子配列判読の結果は、日本 DNA データバンク (DDBJ) のウェブ上で BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 解析を試み相同性検索を行った。

表 1. 奈良県におけるオセルタミビル耐性ウイルスの発生頻度

シーズン	検索	耐性	変位部位	
			275	
2008/09	32	30(93.7)	30	
2007/08	16	0	-	-

## 結果

) 2007/08 および 2008/09 シーズンのオセルタミビル耐性株頻度および変異部位・様式  
現在、オセルタミビル耐性ウイルスは A ソ連型のみ確認されており、2007/08 シーズンの 16 株および 2008/09 シーズンの 32 株について解析を実施した。耐性が確認されたシーズンは 2008/09 シーズンのみで 32 株中 30 株 (93.7%) であった。変異部位および様式は 275 位のアミノ酸がヒスチジンからチロシン (CAT→TAT) にアミノ酸置換していた (表 1)。残りの 2 株 (A/Nara/37/2008, A/Nara/38/2008) は感受性株で 11 月下旬に 1 株、12 月の初旬に 1 株分離されたものであった。NA 領域の BLAST 解析の結果オセルタミビル耐性株は、A/Washington/08/2008 株 (accession No. FJ686982)、A/Australia/404811/2008 株 (accession No. FJ654335) と相同性が高く、感受性株は A/Guangzhou/555/2006 株 (accession No. EU382990) と類似株であった。

) 2007/08 および 2008/09 シーズンのアマンタジン耐性株頻度および変異部位・様式  
2007/08 シーズンのインフルエンザ流行は、A ソ連型を主体とするもので 34 株のソ連型と 1 株の香港型について解析を行った。出現頻度および遺伝子変異の詳細は表 2 に示した。A ソ連型ウイルス 34 株中 20 株 (58.8%)、A 香港型ウイルス 1 株中 1 株 (100%) がアマンタジン耐性でそれらの全てが 31 位のアミノ酸置換 (セリン→アスパラギン、AGT→AAT) を伴う点突然変異株であった。2008/09 シーズンでは A 香港型およびソ連型の混合流行がみられ 14 株すべてに耐性株が確認されたが、32 株のソ連型には耐性は観察されずすべてが感受性株であった。遺伝子部位は昨シーズンと同じ 31 位で変異様式も同様であった。

これらのウイルスはゲノム解析から BLAST 解析を行った結果、A/California/33/2007 (accession No. EU716497) と高い相同性を持つことが判明した。

表 2. 奈良県におけるアマンタジン耐性ウイルス

シーズン	AH 3			AH 1		
	検索 株数	耐性 株数(%)	変異部位 31	検索 株数	耐性 株数(%)	変異部位 31
2008/09	14	14(100)	14	32	0 (0)	-
2007/08	1	1(100)	1	34	20(58.8)	20

### 考察

奈良県の 2 シーズンにおける A 型インフルエンザウイルス薬剤耐性株調査結果から、2007/08 シーズンは A ソ連型ウイルスのアマンタジン耐性株が、2008/09 シーズンでは A 香港型ウイルスのアマンタジン耐性株とオセルタミビル耐性株の流行が明らかとなった。すなわち、アマンタジン耐性株はシーズンが異なるものの香港型とソ連型ウイルスで確認され、共に両者は変異部位および変異様式が同様であった。また、オセルタミビルは 2008/09 シーズンで耐性化が確認された。

世界各国におけるオセルタミビル耐性 A ソ連型ウイルスは、2007 年後半から 2008 年 3 月期で 16%、2008 年 4 月から 9 月期で 44%、2008 年 10 月から 12 月では 92% と驚異的スピードで世界中に広がってきた。これを受け我が国では、昨シーズン (2007/08) 全国的規模で緊急インフルエンザ・サーベイランスが行われたが幸い 2.6% と、北欧諸外国に比べ極めて低い状況であった。しかし、2008/09 シーズンは、本県を含む各地方衛生研究所から高頻度耐性株分離情報が相次いで報告され、結果的に諸外国と同様な蔓延状況となった<sup>3)</sup>。これら A/H1N1 耐性株は国立感染症研究所の報告により、今季のワクチン株 (A/Brisbane/59/2007) を代表とするクレード 2B に属する北欧系統 (D354G) であることが解明されている<sup>4)</sup>。

一方、アマンタジン耐性ウイルスは我々のこれまでの調査からも 2005/06 シーズン以降、継続して香港型およびソ連型ウイルスでその流行が確認されているが、耐性化による重篤化などについては報告されていない。しかし、東南アジアでは現在も燻ぶり続けている A/H5N1 型鳥インフルエンザにも同様にアマンタジン耐性ウイルスが確認されている<sup>9)</sup>。この様な 2 種の薬剤耐性ウイルスが存在する今の状況下で、将来、我々に対し最も脅威を示すであろう A/H5N1 型ウイルスが、オセルタミビルに対する耐性能を獲得することは予想される。これまでわが国は国策としてオセルタミビルの備蓄に努めてきたが、2008/09 シーズンの A ソ連型オセルタミビル耐性化の現状認識から新型インフルエンザ拡大防止策としてザナミビルの備蓄に着手したと聞いている (9:1 の比率)。このことは我が国が世界

的に有数（生産量の約 75%）のオセルタミビル輸入・消費国（厚生労働省発表）であることから、新たなオセルタミビル耐性化ウイルス（A/H3N2 型、A/H5N1）産生国とならない国策を議論すべきで、また、同時に抗インフルエンザ薬剤耐性化の監視サーベイランスのさらなる強化を図ることが極めて重要な位置にあるものと理解している。

#### 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究への助成を頂きました財団法人大同生命厚生事業団に心から深謝申し上げます。

#### 文献

- 1) Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI: Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366: 1175-1181, 2005
- 2) Saito R, Oshitani H, Masuda H, Suzuki H: Detection of amantadine-resistant influenza A virus strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* 40: 84-88, 2002
- 3) 北堀吉映, 今西芳貴, 岡山明子, 井上ゆみ子, 堺 晴美: 奈良県における抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの発生状況 (2008/09): オセルタミビルおよびアマンタジン. *臨床とウイルス* 37:207-210, 2009
- 4) インフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 (第 2 報) *IASR*, 29: 334-339, 2008
- 5) Kaeakami C, Obuchi M, Saikusa M, Noguchi Y, Ujike M, Odagiri T, Iwata M, Toyozawa T, Tashiro M: Isolation of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus of different origins in Yokohama City, Japan, during the 2007-2008 influenza season. *Jpn J Infect Dis* 62: 83-86, 2009

経費使途明細

器具類		
	Mupid-2 plus	¥35,952
	Micro-Centrifuge	¥29,452
	データ解析装置	¥83,065
	計	¥148,469
消耗品		
	クイックジーンSPキット	¥63,000
	マイクロセルカセット	¥115,500
	Taq DNA ポリメラーゼ	¥25,620
	10 $\mu$ フィルターチップ	¥60,900
	20 $\mu$ フィルターチップ	¥30,450
	200 $\mu$ フィルターチップ	¥30,450
	1.5ml平底チューブ	¥18,900
	計	¥344,820
文具類	インクカートリッジ 他 2品	¥6,711
	合計	¥500,000