

25. 薬剤耐性新型インフルエンザウイルス(H1N1pdm)の三重県における発生動向に関する研究

○矢野拓弥（三重県保健環境研究所微生物研究課）

永井佑樹（三重県保健環境研究所微生物研究課）

【目的】

2009年に新型インフルエンザウイルス(H1N1pdm)（以下 A/H1N1 2009）によるパンデミックが発生した。若い年代でのウイルス性肺炎が多く見られ、基礎疾患のないものでも、一部重症化する例が小児に見られた¹⁾。A/H1N1 2009は、M2阻害薬のアマンタジンおよびリマンタジンに耐性であるため、WHOでは新型インフルエンザの治療薬としてNA蛋白を標的とするオセルタミビルおよびザナミビルを推奨している²⁾。

国内での2008/09シーズンのオセルタミビル耐性季節性A/H1N1株の発生頻度は99.6%に達した。過去の調査から、本県も同様の検出率（100%）であった（表1）。これらの耐性株は、ヒトからヒトへの感染伝播によって急速に広がったと考えられる^{3) 4)}。三重県におけるオセルタミビル耐性A/H1N1 2009株検出状況、投薬状況等の関係を調査したので報告する。

表1. オセルタミビル耐性季節性A/H1N1株の検出状況(三重県)

採取年 (シーズン)	調査数	H275Y	検出ウイルス
2007/08	28	0/28(0%)	季節性A/H1N1
2008/09	28	28/28(100%)	季節性A/H1N1

【材料と方法】

対象は2009年6月から2011年3月に本県の医療機関を受診し、インフォームドコンセントの得られたインフルエンザ患者（213名）から採取した臨床検体（咽頭拭い液、鼻汁）を調査材料に用いた（表2）。調査対象者の年齢、臨床検体採取日、発熱、抗インフルエンザ薬投与状況等は医療機関記入の調査票より情報を得た。

臨床検体中のA/H1N1 2009はMDCK細胞（イヌ腎）を用いて増殖させた。A/H1N1 2009分離株はRNAを抽出しRT-PCR法によりノイラミニダーゼ（NA）遺伝子の増幅を行い、オセルタミビル耐性に関与するNA遺伝子の部分塩基配列を決定し、アミノ酸解析を行った⁵⁾。薬剤耐性の指標は、275番目のアミノ酸におけるヒスチジン（H）からチロシン（Y）への置換（H275Y）の有無とした。また、国立感染症研究所が構築したリアルタイムRT-PCR法による薬剤耐性A/H1N1 2009株の検出を実施した⁶⁾。分離したA/H1N1 2009株は赤血球凝集抑制（HI）試験による抗原解析を

実施した。

表2. 採取月別年齢群別薬剤耐性A/H1N1 2009調査数

年	採取月	年 齢 群									計	
		0-1	2-4	5-9	10-14	15-19	20-29	30-39	40-49	50-59		60-
2009	6		2	1	1	1	1	1				7
	7		2	7	8		2	1	1	2		23
	8		4	7	7	7	4	2	3	1	2	37
	9			3	4	3	2	1				13
	10		7	20	9	2			1	1		40
	11	2	6	9	4		2	1			3	27
	12		6	4	1	1	1					13
2010	1		6	5	1				1	1		14
	2		3	1		1						5
	3						1					1
	11		1									1
	12		1	2	1	1						5
2011	1	2	3	3	3	1	1	3			1	17
	2			3	1				1	1		6
	3						2	2				4
	計	4	41	65	40	17	16	11	7	6	6	213

【結果】

三重県のオセルタミビル耐性 A/H1N1 2009 株の検出状況を表 3 に示した。その結果、213 株中 2 株のオセルタミビル耐性株が検出され、発生頻度は 0.94%であった。1 例目は 2009 年 10 月、2 例目は 2009 年 12 月採取の検体から検出された。2 株のオセルタミビル耐性株のうち 1 株はオセルタミビル耐性株と感受性株の混合配列 (H275H/Y) を保持していた。リアルタイム RT-PCR 法による薬剤耐性株検出も同様の結果であった。

表 4 にオセルタミビル投薬日数と耐性株検出状況を示した。1 例目は予防投与および治療投与が 11 日間行われた患者 (6 歳) から分離された。2 例目は治療投与のみを 4 日間行われた患者 (15 歳) から分離され、耐性株と感受性株の混合配列 (H275H/Y) であった。

オセルタミビル耐性株を含む A/H1N1 2009 の県内分離株の抗原性はワクチン株 A/California/7/2009 に類似していた。表 5 に年齢別発熱状況を示した。A/H1N1 2009 が検出された患者の発熱割合は、36℃台 1 名 (0.5%)、37℃台 20 名 (9.4%)、38℃台 78 名 (36.6%)、39℃台 92 名 (43.2%)、40℃台 21 名 (9.9%)、不明 1 名 (0.5%) であった。

表3. オセルタミビル耐性A/H1N1 2009株の検出状況

年	採取月	アミノ酸置換		計
		H275H (感受性)	*H275Y (耐性)	
2009	6	7		7
	7	23		23
	8	37		37
	9	13		13
	10	39	1	40
	11	27		27
	12	12	1	13
2010	1	14		14
	2	5		5
	3	1		1
	11	1		1
	12	5		5
2011	1	17		17
	2	6		6
	3	4		4
計		211	2	213

*混合配列含む

表4. オセルタミビル投与日数と耐性株検出状況

投与日数	アミノ酸置換			計
	H275H (感受性)	H275Y (耐性)	H275H/Y (感受性/耐性)	
投与前	199			
0	9			
1	2			
2	1			
3				
4			1	
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11		1		
計	211	1	1	213

表5. 年齢別発熱状況

年齢	発熱(°C)						計
	36.0-36.9	37.0-37.9	38.0-38.9	39.0-39.9	40.0-	不明	
0-1				2	2		4
2-4		3	11	20	7		41
5-9		4	21	32	8		65
10-14		6	16	15	3		40
15-19		1	9	7			17
20-29		4	8	4			16
30-39		2	3	6			11
40-49	1		4	2			7
50-59			3	2	1		6
60-			3	2		1	6
計	1	20	78	92	21	1	213

【考察】

我が国での A/H1N1 2009 感染による重症例が少ないのは、患者の早期受診と抗インフルエンザ薬の適切な投与等による早期治療開始によるものと考えられている。国内の A/H1N1 2009 株は 2009 年～2011 年 9 月までに 11893 株が解析された。オセルタミビル耐性株は 157 株（1.32%）検出された。本県の調査結果とほぼ同等の検出率（0.94%）であった（表 3）。国内で検出されたオセルタミビル耐性株は、ほとんどが散発例であり、投与状況については、一部を除きオセルタミビルの治療投与または予防投与がされていた事例であった⁴⁾。

本県での調査における 2 例目の患者（治療投与 4 日間）は、アミノ酸解析で耐性株と感受性株の混合配列（H275H/Y）を示した。この臨床検体および分離株を用いてプラーククロニングを実施し、この混合配列を検証した。臨床検体から 8 クローン、分離株から 16 クローンを単離し、NA 遺伝子のアミノ酸解析を実施した。臨床検体から 8 クローン中、7 クローンで H275Y への置換が認められた。分離株では 16 クローン中、7 クローンが H275Y であり、プラーククロニングにおいても耐性株と感受性株の混在が確認された。このことは患者への治療投与 4 日後に採取した検体であったことから、薬剤服用中に患者の体内で耐性株が発生する過程の検体と考えられた。現在のところ、国内でのオセルタミビル耐性株の発生頻度は低率であり、薬剤の選択圧によって散発的に耐性株が発生したと考えられている⁷⁾。

日本はオセルタミビルを大量に使用している現状からも、オセルタミビル耐性の A/H1N1 2009 株が流行の主流になれば、医療機関における治療方針の見直しが必要となる⁸⁾。2007/08 シーズンに北ヨーロッパ由来のオセルタミビル耐性季節性 A/H1N1 株が国内に侵入する以前の検出頻度とほぼ同等⁹⁾であることから、A/H1N1 2009 薬剤耐性株の急速な伝播の可能性も危惧されるので、監視体制の強化が必要である。

本研究成果は、医療機関における投与治療方針の変更の際に科学的根拠となるものである。薬剤耐性株の発生状況を自治体および医療機関に速やかに情報提供することは公衆衛生上極めて重要であり、使用薬剤の選択に有用な情報となるので、今後もモニタリングの継続は必要であると考えられた。

参考文献

1. Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan: A review: One year after the emergence of pandemic (H1N1) 2009 in Japan IASR 2010, 31 : 250-251.
2. 新型および季節性インフルエンザに対する薬物治療ガイドライン http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/index.html
3. Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan:

Detection of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 viruses (H275Y) in Japan during 2008/09 season. IASR 2009, 30:101-106 .

4. Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan: Detection of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1pdm viruses (H275Y) in Japan as of May 7, 2010 IASR 2010, 31: 173-178.
5. Ujike M, Ejima M, Anraku A, Shimabukuro K, Obuchi M, Noriko Kishida N, et al. Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-2010 Emerg Infect Dis. 17: 2011;470-479.
6. Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T, et al.
Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one step RT-PCR assay. J Med Virol 83: 2011;1121-1127.
7. Inoue M, Timothy B, Yee-Sin Leo, Kwai-Peng Chan, Angela Chow, Christopher W. Wong, Raphael Tze-Chuen Lee, Sebastian Maurer-Stroh, Raymond Lin, and Cui Lin Emergence of Oseltamivir Resistant Pandemic (H1N1)2009 Virus within 48 Hours Emerg Infect Dis. 2010;16:1633-1636.
8. Tashiro M, McKimm-Breschkin JL, Saito T, Klimov A, Macken C, Zambon M, et al. Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. Antivir Ther. 2009;14:751-761.
9. Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan: Detection of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus strains with an H275Y mutation in Japan during 2007/08 season. IASR 2008, 29:334-339.

経費使途明細

<u>品名</u>	<u>価格(税込み)</u>
遺伝子解析用消耗品	
・消耗品関連(200 μ lフィルターチップ, 10 μ ショートフィルターチップ, ラテックスLabTex super Grip M, ゲルトレイ)	71,000
PCR産物精製試薬	
・Min elute PCR purification kit(50)	54,826
細胞培養用培養液	
・Dulbeccos Modified Eagles medium	8,400
遺伝子解析用試薬	
・RNase-free Water	23,079
・BigDye Xterminator精製キット, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing	142,695
	<u>¥300,000</u>