

原著

オセルタミビル投与の小児患者から検出された
耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの検討矢野 拓 弥¹⁾

要旨 2009年6月～2013年1月までの三重県におけるオセルタミビル耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスの検出状況を調べた。オセルタミビル耐性株は215株中2株検出され、検出頻度は0.93%であった。耐性株はオセルタミビルによる予防投与および治療投与例から検出された。A(H1N1)pdm09 ウイルスの再流行に備え今後も耐性株モニタリングの継続は必要である。

はじめに

A(H1N1) (AH1 ソ連型) インフルエンザは1977年に流行を起し、その後、数年おきに流行を繰り返してきた。日本国内では2001年2月より、インフルエンザの治療に抗インフルエンザ薬であるオセルタミビルが使用されるようになったが、オセルタミビルの使用量の増加に伴い耐性ウイルスの出現が危惧された。2008/09 シーズンには、北欧が由来とされるオセルタミビル耐性 A(H1N1) ウイルスがヒトからヒトへの感染伝播によって急速に広がり、日本国内における耐性株の検出頻度は前シーズンの2.6%から99.6%へと劇的に増加した^{1~3)}。この原因としては、オセルタミビル耐性 A(H1N1) ウイルスの表面蛋白に、ウイルスの生存に有利なアミノ酸変異が生じたことが影響していると考えられている^{4~6)}。オセルタミビル耐性 A(H1N1) の流行は2009年4月までに概ね終息したと思われたが、同年4月にメキシコおよび北米でブタ由来の新型インフルエン

ザ A(H1N1)pdm09 ウイルス (AH1pdm09) が発生し、世界中に拡がりをみせた。AH1pdm09 感染者は、若い年代でウイルス性肺炎が多くみられ、小児では基礎疾患のないものでも一部重症化する例がみられた⁷⁾。わが国において AH1pdm09 感染による重症例が少なかったのは、患者の早期受診と抗インフルエンザ薬の適切な投与による早期治療開始によると考えられている⁸⁾。

AH1pdm09 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 AH1pdm09 の治療薬としてウイルスの NA 蛋白を標的とする NA 阻害薬オセルタミビルおよびザナミビルを推奨している⁹⁾。世界各国で分離される AH1pdm09 ウイルスの大半は、オセルタミビルおよびザナミビルに対して感受性を示すが、国内外で散発的にオセルタミビル耐性 AH1pdm09 が検出されている。そこで、AH1 ソ連型と同様に耐性ウイルスの蔓延が危惧される AH1pdm09 について、2009年6月～2013年1月までの三重県における耐性株検出状況、ならびにオセルタミビル

Key words : オセルタミビル耐性 A(H1N1)pdm09, H275Y 変異 A(H1N1)pdm09, 薬剤感受性試験

1) 三重県保健環境研究所

[〒512-1211 四日市市桜町 3684-11]

投与患者から検出された耐性株に関する検討を行ったので報告する。

I. 対象と方法

1. 対象

2009年6月～2013年1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患者から採取した臨床検体（咽頭拭い液，気管吸引液，鼻汁）を調査材料とし，real-time RT-PCR法，RT-LAMP法，ウイルス分離の3法^{10～14}によりAH1pdm09が同定された215名を対象に解析を行った。

2. 方法

1) 調査対象者の臨床像

年齢，臨床検体採取日，発熱，臨床症状，抗インフルエンザ薬投与歴などは検査依頼医療機関記入の調査票より情報を得た。

2) NA 遺伝子解析

オセルタミビル耐性ウイルスはNA蛋白に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつことから，耐性ウイルスの検出は，NA遺伝子を対象とした部分シーケンス法および国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターが開発したTaqMan RT-PCR法の2法^{14～17}を用いたH275Y耐性変異のスクリーニングにより実施した。検出にはAH1pdm09分離株および臨床検体から抽出したRNAを用いた。部分シーケンス法ではRT-PCRにより増幅したNA遺伝子（1,143 bp）の塩基配列から，825番目のCAC→TAC置換すなわち275位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）の有無を検索した。また，TaqMan RT-PCR法ではallelic discriminationによりH275Y変異を検出した¹⁶。

3) プラーククローニング

プラーク法によるウイルスの単離には，臨床検体および分離株（ 10^{-4} 希釈）を使用した。MDCK細胞を単層培養したシャーレに検体を100 μ l接種後，CO₂インキュベーター内で34°Cにて1時間吸着後に1%アガロース加培養液を加え3日間培養した¹⁸。単離したウイルスのクローンからRNAを抽出後NA遺伝子を解析し，H275Y耐性変異の有無を検索した。

4) 薬剤感受性試験

NA遺伝子解析により検出されたH275Y耐性変異株について，NA阻害薬であるオセルタミビル，ザナミビルおよびペラミビルに対する感受性試験を国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターにおいて実施した。試験はNA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit（Applied Biosystems）を用いた化学発光法により行った。H275Y耐性参照株としてA/Denmark/528/2009を使用し，感受性参照株にはA/Denmark/524/2009を使用した。各薬剤に対する解析株の感受性は，ウイルスのNA活性を50%阻害する薬剤濃度（IC₅₀）により比較した。

5) 抗原性解析およびHA 遺伝子解析

オセルタミビル耐性AH1pdm09分離株は国立感染症研究所より分与された抗A/California/7/2009（H1N1）pdm09血清，抗A/Victoria/210/2009（H3N2）血清，抗B/Brisbane/60/2008（Victoria系統）血清および抗B/Bangladesh/3333/2007（山形系統）血清を使用し0.75%モルモット血球を用いた赤血球凝集抑制（HI）試験により抗原性解析を行った。また耐性株と代表的な感受性株についてシーケンス法によりHA遺伝子¹¹の塩基配列を解析した。

II. 結果

1) 調査対象者の臨床像

調査対象者215名の検体採取月別年齢群を表1に示した。

平均年齢は14.7歳（0～79歳）であった。2～4歳群から10～14歳群は147名（68.4%）を占めた。内訳は，5～9歳群が65名（30.2%）と最も多く，次いで2～4歳群が42名（19.5%），10～14歳群が40名（18.6%）であった。年齢群別の発熱の程度を表2に示した。平均体温は38.7±0.7°Cであった。38°C以上が193名（89.8%）であった。内訳は，38°C台が79名（36.7%），39°C台が93名（43.3%），40°C台が21名（9.8%）であった。入院を伴う事例が57例あり，いずれも重症例（肺炎18例，意識障害10例）あるいは基礎疾患患者（喘息および糖尿病など29例）であったが，対象者の多く（158例）は季節性インフルエ

表 1 検体採取年月別年齢群

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
2013	1	1	1									2
	計	5	42	65	40	17	16	11	7	6	6	215

表 2 年齢別発熱の程度

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			1	2	2		5
2~4		3	11	21	7		42
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	79	93	21	1	215

ンザ症状に類似し軽症であった。

2) H275Y 耐性変異株の検出およびオセルタミビル投薬状況

215 株の NA 遺伝子を解析した結果、H275Y 耐性変異が認められたのは 2 株で、検出頻度は 0.93% であった。対象者 215 名中 201 名はオセルタミビル投薬前に、12 例は投与後 48 時間以内に検体が採取されていたが、いずれも H275Y 耐性変異は認められなかった。残り 2 名のうち 1 名 (6

歳児) は、予防投薬および治療投薬が 264 時間 (11 日間) 行われた後の検体採取で、1 名 (15 歳児) は治療投薬のみを 114 時間 (4.75 日間) 行われた後に検体採取され、いずれも H275Y 耐性変異が認められた (表 3)。

H275Y 耐性変異が認められた 1 例目 (A/Mie/100/2009) は 2009 年 10 月、2 例目 (A/Mie/137/2009) は 2009 年 12 月に検体採取された分離株であった (表 4)。2 株の H275Y 耐性変異株のうち、

表 3 調査対象者の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	201			
0	8			
1	2			
2	2			
3				
4			1	
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11		1		
計	213	1	1	215

H: ヒスチジン, Y: チロシン

部分シーケンス法により, A/Mie/100/2009 は単一波形であったが, A/Mie/137/2009 は分離株と臨床検体の両方がオセルタミビル耐性株(H275Y)と感受性株(H275)の混合配列(H275H/Y)を保持していることが明らかになった(図). さらに TaqMan RT-PCR 法による解析結果からも同様に耐性株と感受性株の混在が示された.

3) H275Y 耐性変異ウイルスの単離

耐性株と感受性株の混合配列をもつ A/Mie/137/2009 について, 臨床検体および分離株(10⁻⁴希釈)を用いてプラーククロニングを実施し, H275Y 耐性変異ウイルスの単離を試みた(表 5). その結果, 臨床検体からは 24 クローン中 14 クローン(58.3%), 分離株からは 14 クローン中 6 クローン(42.9%)で H275Y 変異が認められた. したがって, 両サンプルにおいて H275Y 耐性変異の含有が確認された.

4) H275Y 耐性変異株の NA 阻害薬に対する感受性試験

感受性参照株として用いた A/Denmark/524/2009 のオセルタミビル, ペラミビルおよびザナミビルに対する IC₅₀値は 0.10 nM, 0.07 nM, 0.29 nM であった. 一方, 本県で分離した A/Mie/100/

表 4 採取年月別オセルタミビル耐性の検出状況

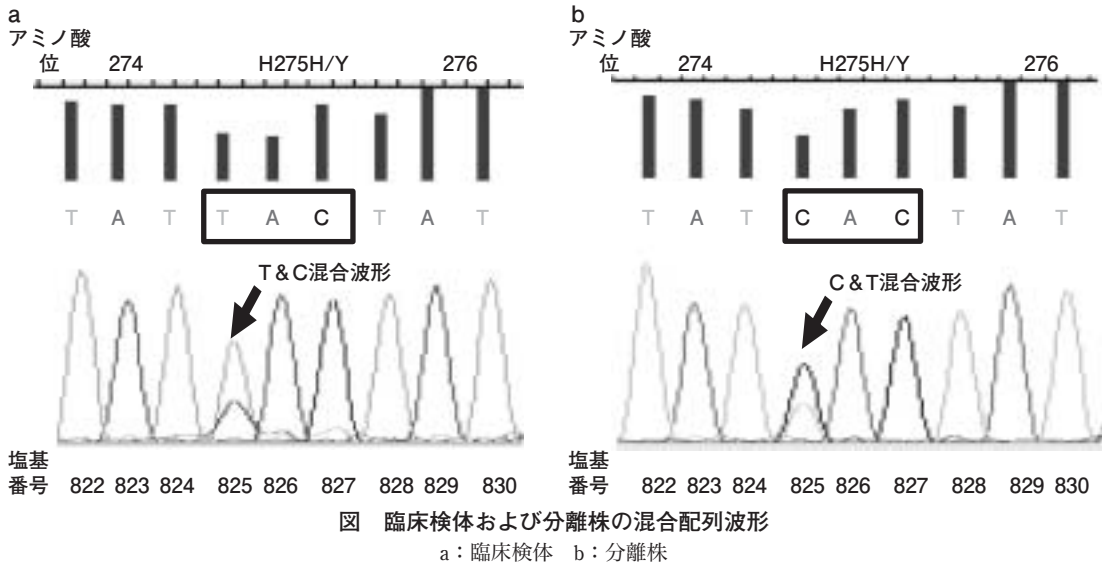
年	採取月	アミノ酸置換				計
		H275H (感受性株)		*H275Y (耐性株)		
		薬剤 投与前	薬剤 投与後	薬剤 投与前	薬剤 投与後	
2009	6	7				7
	7	21	2			23
	8	35	2			37
	9	13				13
	10	37	2		1	40
	11	22	5			27
2010	12	12			1	13
	1	14				14
	2	4	1			5
	3	1				1
	11	1				1
	12	5				5
2011	1	17				17
	2	6				6
	3	4				4
2013	1	2				2
	計	201	12	0	2	215

*混合配列含む

2009 の IC₅₀値はおのおの 62.20 nM, 6.80 nM, 0.46 nM で, 感受性参照株と比較してオセルタミビルに対して約 620 倍, ペラミビルに対して約 100 倍感受性が低下していたが, ザナミビルに対しては感受性を保持していた. NA 遺伝子解析で耐性株と感受性株の混合配列を検出した A/Mie/137/2009 のオセルタミビル, ペラミビルおよびザナミビルに対する IC₅₀値は 0.16 nM, 0.08 nM, 0.22 nM で, いずれも感受性参照株と同等であった.

5) オセルタミビル耐性 AH1pdm09 ウイルスの抗原性解析および HA 遺伝子解析

本県で分離した 2 株のオセルタミビル耐性 AH1pdm09 (A/Mie/100/2009, A/Mie/137/2009) は, 抗 A/California/7/2009 (H1N1)pdm09 血清(ホモ価 1,280) に対して HI 価 640~1280 を示し, 抗原性は 2009/10~2012/13 シーズンの AH1pdm09 ワクチン株 A/California/7/2009 に類似していた. 一方, 抗 A/Victoria/210/2009 (H3N2) 血清(同



1,280), 抗 B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統) (同 2,560) 血清および抗 B/Bangladesh/3333/2007 (山形系統) 血清 (同 2,560) に対しては, 2 株とも HI 価は 10 未満であった。

両株の HA 遺伝子を A/California/7/2009 と比較したところ, アミノ酸部位 (83, 203, 209, 223, 321) に以下の変異が認められた, P83S (プロリン→セリン), S203T (セリン→トレオニン), T209K (トレオニン→リシン), R223Q (アルギニン→グルタミン), I321V (イソロイシン→バリン)。また, A/Mie/137/2009 には V249M (バリン→メチオニン) 変異も認められた。

III. 考 察

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターの集計によると, 日本国内では, 2009 年 6 月～2013 年 6 月までに 12,084 株中 159 株 (1.32%) (2009/10 年 79/8,145 株, 2010/11 年 78/3,844 株, 2011/12 年 0/11 株, 2012/13 年 2/84 株) の AH1pdm09 オセルタミビル耐性株が報告されている¹⁹⁾。本県においても, 前述の国内の解析結果とほぼ同等の検出率 (0.94%) であった。国内のオセルタミビル耐性株は, ほとんどがオセルタミビルあるいはペラミビルの治療投与または予防投与患者から検出される散発例である^{20,21)}。本県

表 5 臨床検体および分離株のプラーククロニングによるオセルタミビル耐性株の含有割合

対象	H275H (感受性株)	H275Y (耐性株)	含有割合 (%)
臨床検体 (A/Mie/137/2009)	10	14	14/24 (58.3%)
分離株 (A/Mie/137/2009)	8	6	6/14 (42.9%)

275 番目のアミノ酸が H (ヒスチジン) から Y (チロシン) への置換を耐性株の指標とした

で小児から検出された 2 株についても, 薬剤投与後の採取検体による事例であった。治療投与 4 日後に採取された検体からは, 耐性株と感受性株の混合配列 (H275H/Y) が検出された。この検体は, 薬剤服用中に患者の体内で耐性株が選択される過程の検体である可能性が考えられる。2010 年には奈良県においても, 同様の事例が報告されており²²⁾。また薬剤投与後 48 時間ほどでの耐性株の出現も報告されている²³⁾。

H275Y 変異以外の耐性変異については多くの報告があるが^{24,25)}。2012 年に WHO の専門家会議による薬剤耐性株の分類と定義が初めて示された²⁶⁾。H275Y 変異以外の耐性変異に関しては, NA

遺伝子解析と NA 阻害薬に対する感受性試験を並行して実施することが求められている。

日本はオセルタミビルを大量に使用している現状から、オセルタミビル耐性ウイルスが流行の主流となれば、医療機関における治療方針の見直しが必要となる²⁷⁾。2008/09 シーズンには北歐由来のオセルタミビル耐性 AH1 ソ連型ウイルスが世界中に広がり、日本国内でもオセルタミビル耐性株の検出頻度は 99.6% に達した。

AH1pdm09 についても、同様に薬剤耐性株の急速な伝播の可能性が危惧される。実際に豪州では、2011 年 5~9 月にかけて患者 191 人から検出された AH1pdm09 のうち、29 例 (15%) がオセルタミビル耐性の H275Y 耐性変異株であった。これらの患者 29 例中 28 例ではオセルタミビル投与歴がなかったことが報告されている。幸いなことに、すべてのオセルタミビル耐性株はザナミビルに対して感受性を示し、また耐性株の流行がさらに拡大することはなかった²⁸⁾。

2011/12 シーズンは国内外ともに AH1pdm09 の流行は極めて小さく、国内で分離された AH1pdm09 は 12 株であった。このうち国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターで抗原性解析された 2 株について、2011 年 10 月分離の 1 株はワクチン株 A/California/7/2009 類似株であったが、2012 年 1 月分離の 1 株は同ワクチン株に対して HI 価が 16 倍低下した変異株であったことが報告されている²⁹⁾。2012/13 シーズンは本県では 2013 年 1 月に 2011 年 3 月以来の AH1pdm09 が検出された。国内での分離株の抗原性解析ではワクチン類似株が流行の主流であるが、変異株が 5% で確認され³⁰⁾、抗原性変異株による再流行の可能性も懸念される。

本研究において、薬剤投与群は 14 例中 2 例で耐性株が検出されているが、投与前あるいは投与後早期に検体採取された群は、耐性株は検出されていない。今後は薬剤投与前に検体採取された群に関する耐性株モニタリングが重要である。耐性株モニタリングの結果は医療機関において患者の治療方針を決定する際の科学的根拠となり、薬剤耐性株の発生状況を医療機関および自治体に速やかに情報提供することは、公衆衛生上極めて重要

であると考えられる。

謝辞：本稿を終えるにあたり、本研究に対しご助言くださいました国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターの高下恵美先生、小田切孝人先生、三重県保健環境研究所の山口哲夫所長、天野秀臣特別顧問、片山正彦総括研究員、福田美和主任研究員、当研究所の微生物研究課員に深謝申し上げます。

本研究の一部は大同生命厚生事業団研究助成を受けて行った。また本論文の一部は、同事業団に研究報告した。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター：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]。病原微生物検出情報 29 : 334-339, 2008
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：2008/09 インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第 2 報]。病原微生物検出情報 30 : 101-106, 2009
- 3) Ujiie M, et al : Oseltamivir-resistant A/H1N1 viruses during the 2007-2009 influenza seasons, Japan. *Emerg Infect Dis* 16 : 926-935, 2010
- 4) Rameix-Welti MA, et al : Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. *PLoS Pathog* 4 : e1000103, 2008
- 5) Bloom JD, et al : Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science* 328 : 1272-1275, 2010
- 6) Ginting TE, et al : Amino acid changes in hemagglutinin contribute to the replication of oseltamivir-resistant H1N1 influenza viruses. *J Virol* 86 : 121-127, 2012
- 7) 国立感染症研究所感染症情報センター：パンデミック (H1N1) 2009 発生から 1 年を経て。病原微生物検出情報 31 : 250-251, 2010

- 8) Sugaya N, et al : Very low pandemic influenza A (H1N1)2009 mortality associated with early neuraminidase inhibitor treatment in Japan : Analysis of 1000 hospitalized children. *J Infect* 63 : 288-294, 2011
- 9) WHO : 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)
- 10) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ (2009年5月 ver.1)
- 11) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ (2009年11月 ver.2)
- 12) 矢野拓弥, 他 : Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification 法による新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm) 迅速検出法の有用性. *日本環境感染学会誌* 26 (5) : 305-310, 2011
- 13) 飛田清毅 : MDCK 細胞によるインフルエンザの分離. *臨床とウイルス* 4 (1) : 58-61, 1976
- 14) 国立感染症研究所 : インフルエンザ診断マニュアル (第2版), 2012
- 15) 国立感染症研究所 : 新型インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランス : A/H1N1pdm-NA 遺伝子解析実験プロトコール, 2011
- 16) Nakauchi M, 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 : 1121-1127, 2011
- 17) 国立感染症研究所 : A/H1N1pdm09H275Y 耐性株検出法実験プロトコール (2011年8月 ver.2)
- 18) Nakajima S, et al : Comparison of epitope structures of H3HAs through protein modeling of influenza A virus hemagglutinin : Mechanism for selection of antigenic variants in the presence of a monoclonal antibody. *Microbiol Immunol* 51 (12) : 1179-1187, 2007
- 19) 国立感染症研究所感染症情報センター : 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-inf.html#taiseikabu>)
- 20) Ujike M, et al : Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic(H1N1)2009 virus, Japan, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 17 : 470-479, 2011
- 21) 国立感染症研究所感染症情報センター : 新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第2報]. *病原微生物検出情報* 31 : 173-178, 2010
- 22) 米田正樹, 他 : オセルタミビル服用による薬剤耐性獲得の一事例について. *臨床とウイルス* 39 (5) : 284-289, 2011
- 23) Inoue M, et al : Emergence of oseltamivir resistant pandemic(H1N1)2009 virus within 48 hours. *Emerg Infect Dis* 16 : 1633-1636, 2010
- 24) Colman PM, et al : Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* 67 (6) : 2972-2980, 1993
- 25) 鈴木 宏, 他 : 薬剤耐性 2009pandemicA(H1N1) ウイルス出現のメカニズム. *臨床とウイルス* 38 (1) : 83-88, 2010
- 26) WHO : Interpretation criteria to define phenotypic surveillance data. *Weekly epidemiological record* 39 : 372, 2012
- 27) Tashiro M, et al : Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. *Antivir Ther* 14 : 751-761, 2009
- 28) Hurt AC, et al : Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza in Australia. *J Infect Dis* 206 (2) : 148-157, 2012
- 29) 岸田典子, 他 : 国内のインフルエンザ流行株の抗原性, 遺伝子系統樹解析, 薬剤耐性株検出状況—2011/12 シーズン途中経過. *病原微生物検出情報* 33 : 95-97, 2012
- 30) 岸田典子, 他 : 国内インフルエンザ流行株の抗原性解析および薬剤耐性株の検出状況 (途中経過) (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/flu-iasrs/3403-pr3991.html>), 2013

**Investigation of the resistant A(H1N1)pdm09 virus
detected from a pediatric patient receiving oseltamivir**

Takuya YANO

Mie Prefecture Health and Environment Research Institute

This study investigated the detection status of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 virus in Mie Prefecture from June 2009 to January 2013. From 215 A(H1N1)pdm09 virus strains, two were found to be oseltamivir-resistant, with a detection frequency of 0.93%. These two resistant strains were detected in cases in which oseltamivir was administered prophylactically and therapeutically. Continuous monitoring of resistant strains is required for preparation of a future resurgence of the A(H1N1)pdm09 virus.

(受付：2013年3月25日，受理：2013年7月11日)

* * *