

## オセルタミビル(タミフル®)耐性インフルエンザウイルスの監視(感受性サーベイランス)と検査法について

### 1 はじめに

2009年4月メキシコ及び米国で発生が探知されたブタ由来の新型インフルエンザ(A/H1pdmN1)は、その後世界中に蔓延した。このウイルスの抗原性はスペイン風邪と類似しており1958年以降に出生したほとんどの人が免疫を持っておらず、日本でも小児を中心に季節外れの流行(パンデミック第1波)を起こした。インフルエンザの治療にはオセルタミビル(Oseltamivir: 商品名タミフル)が主に用いられるが、2009年以降検出されたAソ連型ウイルスの99%がオセルタミビルに耐性を示している<sup>1)</sup>。国内においても2007/08シーズンに分離されたAソ連型ウイルス株中の薬剤耐性株の出現頻度は2.6%であったものが、翌2008/09シーズンには99.6%となり、一年間で薬剤耐性ウイルスが蔓延した<sup>2)</sup>。AH1pdmウイルス株は2010年4月現在オセルタミビルに対して大部分が感受性を示している。しかし、AH1pdmウイルスはAソ連型ウイルスと同じH1N1亜型に属しており、同様の薬剤耐性ウイルスに置き換わるおそれは否定できない。既にオセルタミビル耐性AH1pdmウイルス株が日本を含む世界各地から報告されており<sup>3,4)</sup>、薬剤耐性ウイルス株の発生状況やその感染拡大の動向等を継続的に監視(サーベイランス)する必要がある。

### 2 インフルエンザウイルスと抗インフルエンザ薬

ヒトにインフルエンザを発症させるA型及びB型インフルエンザウイルスは粒子表面にヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)の2種類のスパイク状の糖タンパク質をもち、HAは細胞レセプターとのリガンドとして作用し、一方のNAはノイラミニダーゼ酵素活性を有している。HA及びNAはウイルスの感染及び増殖に必須であるばかりでなくワクチンの主な標的としても重要である。A型インフルエンザウイルスにはHAの抗原性によりH1~H16の亜型、NAの抗原性によりN1~N9の亜型が存在する。ヒトの間で流行した記録のあるA型インフルエンザは、HA、NAの亜型の組み合わせでH3N2(A香港型)、H1N1(Aソ連型など)、H2N2(「アジアかぜ」と表記される3通りのみである。このほか抗ウイルス剤の標的分子としてA型インフルエンザウイルスにはさらにM2タンパク質という膜貫通タンパク質が存在する(インフルエンザウイルスの詳細については技術情報Vol. 29 No. 3 2005 <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/2f/20052903.pdf> 参照)。

現在認可されている抗インフルエンザ薬は、その作用機序によりM2阻害剤とノイラミニダーゼ阻害剤の2種類に分けられる。

1)M2阻害剤はM2タンパク質のH<sup>+</sup>イオンチャンネル活性を阻害し、ウイルスが脱殻することを

妨げ増殖を抑制する。M2 阻害剤のアマンタジンは A 型インフルエンザウイルスにのみ存在する M2 タンパク質の機能を阻害するため、B 型インフルエンザウイルスには効果がない。2006/07 シーズン以降、A ソ連型及び A 香港型において、アマンタジン耐性ウイルスが増加しており、世界保健機関 (World Health Organization : WHO) は抗インフルエンザ薬としての使用を避けるよう勧めている。2009 年に流行した AH1pdm ウイルスは流行当初より既にアマンタジン耐性を獲得していた<sup>5)</sup>。

2) ノイラミニダーゼ阻害剤はノイラミニダーゼタンパク質 (糖鎖末端のシアル酸を切り離す酵素活性を持つ) の立体構造の解析から、活性部位に結合し酵素活性を阻害するようデザインされた薬剤である。ノイラミニダーゼ活性阻害を受けたインフルエンザウイルスは、感染細胞表面に存在するシアル酸 (別名ノイラミン酸) を切り離すことができず、感染した細胞から遊離できなくなるため未感染細胞への感染拡大が抑制される。ノイラミニダーゼ阻害剤にはオセルタミビル、ザナミビル (Zanamivir: 商品名リレンザ) のほか 2010 年 1 月に新たに厚生労働省に承認されたペラミビル (Peramivir: 商品名ラピアクタ) 及び開発中のラニナミビル (Laninamivir: CS-8958) がある。ノイラミニダーゼは A 型及び B 型のインフルエンザウイルスの間で相同性が保存されているため、何れのウイルスにも有効である。オセルタミビルについては前述のとおり、近年 A ソ連型インフルエンザウイルスにおいて耐性ウイルスが世界各地で高率に検出されている。

M2 阻害剤やノイラミニダーゼ阻害剤のほかにも、インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼを阻害する新規抗インフルエンザ薬、ファビピラビル (Favipiravir: T-705) が開発中である。

### 3 インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性獲得機序

インフルエンザウイルスがオセルタミビルに対して耐性を獲得する機序として以下の 2 つが報告されている。1 つは、ノイラミニダーゼ活性部位のアミノ酸置換により立体構造が変化し、オセルタミビルが効率よくノイラミニダーゼに結合できなくなる直接的な機序である。もう 1 つは、ヘマグルチニンにアミノ酸置換変異が生じた結果感染細胞表面に存在するシアル酸との結合力が低下し、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ活性の依存度が低くなる間接的な機序である<sup>6)</sup>。インフルエンザ患者から分離されたオセルタミビル耐性ウイルスの多くはノイラミニダーゼの変異のみで耐性を獲得している。

オセルタミビルはインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ分子の基質結合構造に結合する際に、オセルタミビル分子に適したポケットを形成するよう分子構造を変化させる。ノイラミニダーゼ分子のポケット形成に関わる部分のアミノ酸に変異が起こり、構造が変化すると、オセルタミビルはノイラミニダーゼと強固に結合できず、ウイルスは耐性を獲得することになる<sup>7)</sup>。A 香港型ではノイラミニダーゼ (N2 亜型) の 119 番のグルタミン酸がバリン (E119V) に、292 番のアルギニンがリジン (R292K) に、294 番のアスパラギンがセリン (N294S) に変異すると耐性を獲得することが知られており、A ソ連型及び AH1pdm ではノイラミニダーゼ (N1 亜型) の 275 番のヒスチジンがチロシン (H275Y) に変異することが知られている<sup>7)</sup>。このうち R292K の変異はノイラミニダーゼが直接シアル酸と結合する活性中心の変異で、E119V、N294S、H275Y の変異はポケット形成に関わる骨格部分の変異である。オセルタミビル感受性はこれらのアミノ酸置換変異の影響を受け、とりわけシアル酸と直接結合する活性中心にアミノ酸変異が生じた場合、骨格部位のアミノ酸変異よりも高度に耐性となる。別の

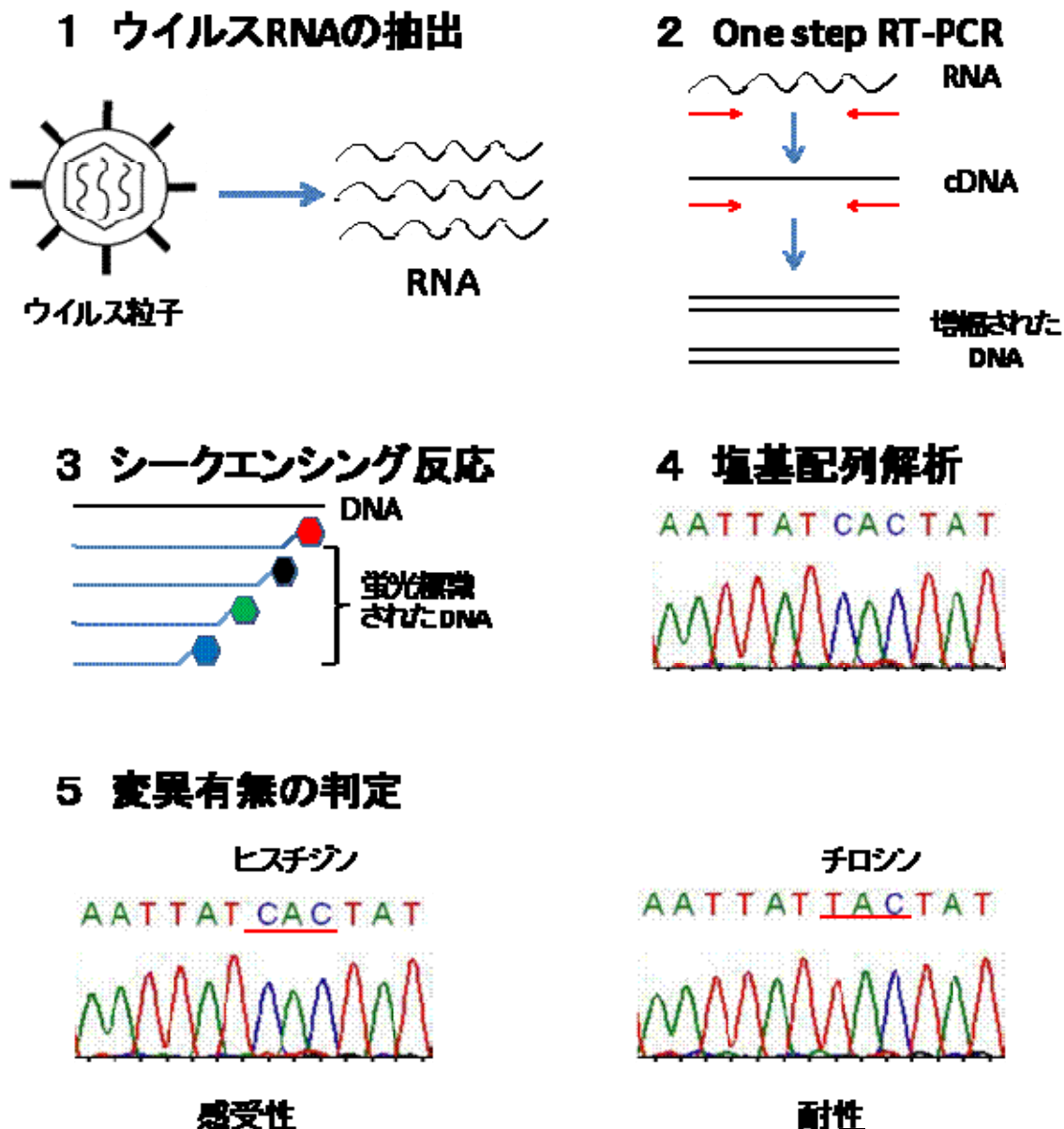


図1 国立感染症研究所・実験プロトコール(A/H1N1pdm-NA 遺伝子解析)の概要

ノイラミニダーゼ阻害剤であるザナミビル分子の構造はオセルタミビルより本来の基質(シアル酸)に似ているため、結合に際してオセルタミビルのようなノイラミニダーゼ分子の構造変化を必要としない。このため前述のようなポケット形成に関わる骨格部分のアミノ酸変異によりノイラミニダーゼの分子構造が変化したオセルタミビル耐性ウイルスにも効果がある。

**4 オセルタミビル感受性サーベイランス(耐性遺伝子マーカーの検出方法)**

インフルエンザ患者から分離されたオセルタミビル耐性 AH1pdm ウイルス株は何れもノイラミニダーゼタンパク質に H275Y 変異を持っている。そこでオセルタミビル感受性サーベイランスでは H275Y 変異を薬剤耐性のマーカーとして検査を行う。図1に国立感染症研究所より示されている耐性マーカー検出のための実験プロトコール(A/H1N1pdm-NA 遺伝子解析)の概要を示し、以下にその説明を加える。

- 1) RNA 抽出キットを用い、インフルエンザ検体よりウイルス RNA を抽出する。
- 2) AH1pdm のノイラミニダーゼ遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR(reverse transcription- polymerase chain reaction) 法により、耐性マーカー(H275Y)を含む遺伝子断片を増幅する。RT-PCR 法：逆転写酵素を用いて RNA から cDNA を合成(RT)後、耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて PCR により遺伝子断片を増幅する方法。
- 3) 増幅した遺伝子断片に蛍光標識された核酸を取り込ませるシーケンシング反応を行う。
- 4) DNA シーケンサーを用い得られた遺伝子断片の塩基配列の自動解析を行う。A G C T の 4 種類の塩基に相当する 4 色の波形が得られる。
- 5) 塩基配列の解析結果より変異があるかどうかを判定する。オセルタミビル感受性ウイルスではノイラミニダーゼの 275 番のヒスチジンに相当するコドンは CAC だが、耐性ウイルスでは TAC に変わっており、これはチロシンのコドンである。すなわち耐性ウイルスではヒスチジンからチロシンへの変異(H275Y)が起こっている。

## 5 愛知県におけるオセルタミビル耐性遺伝子マーカー検出状況

平成 22 年 3 月 31 日までに、当衛生研究所へ搬入されたウイルスサーベイランス検体及び AH1pdm 疑い検体の中から AH1pdm と確定したウイルス分離株及び検体 166 件のオセルタミビル耐性遺伝子マーカーの検索を行い、分離株 4 株(2.4%)にノイラミニダーゼの H275Y 変異を検出している(なお名古屋市衛生研究所から別途 2 件の耐性変異報告あり)。国立感染症研究所による薬剤感受性試験(合成基質を用いた化学発光法)の結果、4 株中 3 株について感受性株に比べオセルタミビルに対する感受性低下

(IC50 : 50%抑制濃度値が約 200~400 倍に上昇)が認められた。また、これらのオセルタミビル耐性株はザナミビルに対しては感受性株と同等の感受性を保持していた。4 株中残る 1 株については塩基配列解析において T と C の両塩基の波形が認められた(図 2)。これは同一検体中にオセルタミビル感受性ウイルス株と耐性ウイルス株が混在(275H/Y)していることを示している。インフルエンザ患者の体内で薬剤治療中に耐性ウイルスが発生していると考えられる例である。平成 22 年 4 月 5 日現在、全国で分離された AH1pdm ウイルス株及び AH1pdm 検査検体の 5422 件中 67 件(1.2%)にオセルタミビル耐性マーカーが検出されている<sup>3)</sup>。

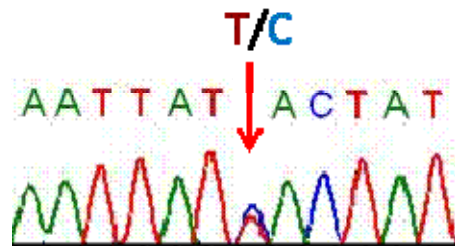


図2 オセルタミビル感受性株と耐性株の混合例

## 6 おわりに

現在のところオセルタミビル耐性 AH1pdm ウイルスのヒトからヒトへの感染報告は少なく、まだ地域社会に拡散してはいない。しかし、オセルタミビルを大量に使用する日本では耐性出現に対する監視がとりわけ重要である。2008/09 シーズンに国内で分離された A ソ連型ウイルス株の 99%がオセルタミビル耐性株であった。世界的にもオセルタミビル使用量の少ない国からも耐性株が報告されており、これら耐性株の多くは薬剤の選択圧で発生したのではない。また、流行の規模から耐性 A ソ連型株は既に感受性株と同等の感染力を獲得している。一方、AH1pdm 耐性株はその多くが薬剤の治療投与中に見つかっていることから、まだヒトの間で効率よく伝播する性質を獲得してい

ないと考えられる。しかし、AH1pdm ウイルスと薬剤耐性の A ソ連型ウイルスとの間で遺伝子交雑(reassortment)が起これば、AH1pdm 耐性ウイルスが流行の主流となる可能性がある。今後は上述した伝播力の高い AH1pdm 耐性ウイルスの出現のみならず、H275Y 以外の変異に伴うオセルタミビル耐性やザナミビル等他の薬剤への耐性獲得についてもサーベイランスの継続が必要である。

## 7 参考文献

- 1) WHO ホームページ：オセルタミビル耐性インフルエンザウイルス (A/H1N1) 株出現頻度情報  
[http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1\\_table/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1_table/en/index.html).
- 2) 病原微生物検出情報 30: 101-106, 2009.  
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/30/350/pr350.3.html>
- 3) 国立感染症研究所ホームページ：インフル

エンザウイルス分離・検出速報  
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/influ.html>.

- 4) Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 influenza virus, October 2009. Weekly epidemiological record 84: 453-459, 2009.
  - 5) Neumann G., Noda T. and Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature 459: 931-939, 2009.
  - 6) Tisdale M. Monitoring of viral susceptibility : new challenges with the development of influenza NA inhibitors. Rev. Med. Virol. 10: 45-55, 2000.
  - 7) Moscona A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. New Engl. J. Med. 360: 953-956, 2009.
- (文責：生物学部 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子)

---

愛知衛研技術情報 第34巻第2号 平成22(2010)年 4 月 30 日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号

愛知県衛生研究所のホームページ【<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>】

所 長 室：	052-910-5604	衛生化学部長：	052-910-5638
次 長：	052-910-5683	医薬食品研究室・生活安全化学担当：	052-910-5638
研 究 監：	052-910-5684	医薬食品研究室・食品安全化学担当：	052-910-5639
総 務 課：	052-910-5618	医薬食品研究室・医薬品化学担当：	052-910-5629
企画情報部長：	052-910-5619	生活科学研究室・水道水質担当：	052-910-5643
健康科学情報室：	052-910-5619	生活科学研究室・環境水質担当：	052-910-5644
生物学部長：	052-910-5654	生活科学研究室・環境保健担当：	052-910-5664
ウイルス研究室：	052-910-5674		
細菌研究室：	052-910-5669	代表 FAX：	052-913-3641
医動物研究室：	052-910-5654		