

原 著

## 家族内感染が疑われたオセルタミビル投与前の小児患者から検出された抗インフルエンザ薬耐性 A (H1N1) pdm09 ウイルス

矢野拓弥, 高下恵美\*, 江島美穂\*, 藤崎誠一郎\*, 中村一哉\*,  
楠原 一, 赤地重宏, 小林隆司, 西中隆道

**Anti-influenza drug-resistant A(H1N1)pdm09 virus detected from a child who was suspected familial infection but had not been administered with oseltamivir**

Takuya YANO, Emi TAKASHITA, Miho EJIMA, Seiichirou FUJISAKI,  
Kazuya NAKAMURA, Hajime KUSUHARA, Shigehiro AKACHI,  
Takashi KOBAYASHI and Takamichi NISHINAKA

2013年9月から2014年4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(オセルタミビル耐性ウイルス)の検出状況を調べた。オセルタミビル耐性ウイルスは41例中4例(9.8%)検出され、そのうち薬剤投与前の小児患者から1例検出された。本事例は、札幌市でオセルタミビル耐性ウイルスが多数検出された地域流行時に本患児とその家族が札幌市に滞在していたことと、札幌市と本県の患児から検出されたオセルタミビル耐性ウイルスとの遺伝子配列が一致していたことから、札幌市で感染し、三重県に持ち帰ったケースと考えられた。今後、国内でのオセルタミビル耐性ウイルスの出現状況を注意深くモニタリングし、医療機関へ迅速に情報提供していくことは投与薬剤の選択戦略を検討する上で有用だと思われる。

キーワード：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

### はじめに

2009年4月に豚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<sup>1)</sup>。

国内では、これまでに検出された AH1pdm09 から散発的にオセルタミビル耐性 AH1pdm09 (オセルタミビル耐性ウイルス) が検出されている<sup>2)</sup>。特に2009年の流行時には若い世代でウイルス性肺炎が多数確認され、基礎疾患のない小児においても一部重症化<sup>3)</sup>の傾向がみられた。

我が国はオセルタミビル(商品名:タミフル)を多用している現状から、薬剤耐性を獲得した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<sup>4)</sup>。2013/14 シーズンは、2009/10 シーズン以来の

AH1pdm09 による流行がみられ、2013年11月～2014年初めに、札幌市を中心にオセルタミビル耐性ウイルスの地域流行<sup>5)</sup>があったことから、国立感染症研究所と地方衛生研究所では、薬剤耐性ウイルスの監視体制を強化した<sup>6)</sup>。著者らは以前、本県における薬剤投与後の患者から検出されたオセルタミビル耐性ウイルスについて報告<sup>7)</sup>したが、今回、本県で初めて薬剤投与前の小児患者から薬剤耐性ウイルスが検出されたので以下に報告する。

### 対象と方法

#### 1. 調査対象

2013年9月から2014年4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、

\* 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

Table 1. Detection of the oseltamivir resistant A(H1N1)pdm09 virus

Year	Month	Amino acid substitution		Total
		H275H (Sensitivity)	H275Y (Resistant)	
2013	9	3		3
	10			
	11			
	12		1	1
2014	1	21		21
	2	8	1	9
	3	4	2	6
	4	1		1
Total		37	4	41

Amino acid (H: Histidine, Y: Tyrosine)

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<sup>8-10)</sup>により 41 名から検出および分離した AH1pdm09 を対象にオセルタミビル耐性ウイルスのスクリーニングを行った. 調査対象者の臨床検体採取日, 抗インフルエンザ薬投与歴等の臨床情報は検査依頼医療機関記入の調査票の情報を基に集計を行った.

## 2. オセルタミビル耐性ウイルスの検出

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, 耐性株の検出は, ノイラミニダーゼ (Neuraminidase : 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<sup>11,12)</sup>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 (1143bp) 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<sup>12)</sup>.

## 3. 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, 4 種類の NA 阻害薬 (オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビル, ラニナ

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-Fluor Influenza Neuraminidase Assay Kit (Applied Biosystems) を用いた蛍光法により行った. 各々の NA 阻害薬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 (IC<sub>50</sub>) により比較した<sup>12)</sup>.

## 4. 赤血球凝集抑制試験による抗原解析

オセルタミビル耐性ウイルス株について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抗 A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 フェレット血清を使用し 0.5% 七面鳥血球を用いた赤血球凝集抑制 (Hemagglutination inhibition : HI) 試験<sup>10)</sup>により抗原性解析を行った.

## 5. HA および NA 遺伝子系統樹解析

オセルタミビル耐性ウイルス株と代表的な感受性株についてシーケンス法によりヘマグルチニン (Hemagglutinin : HA) 遺伝子および NA 遺伝子の塩基配列を決定し遺伝子系統樹解析を実施した<sup>10)</sup>.

## 結果

### 1. H275Y 耐性変異株検出状況

2013 年 9 月から 2014 年 4 月に検出された AH1pdm09 (41 株) の NA 遺伝子について H275Y 耐性変異に関するスクリーニングを実施したところ, オセルタミビル耐性ウイルスが

Table 2. Detection of oseltamivir resistant A(H1N1)pdm09 virus and oseltamivir administration of days

Period of administration (day)	Amino acid substitution		Total	Resistance rate (%)
	H275H (Sensitivity)	H275Y (Resistant)		
unadministered	32	1	33	3
0	2		2	0
1	1		1	0
2	1		1	0
3	1		1	0
4			0	-
5		3	3	100
Total	37	4	41	9.8

4 株 (9.8%) 確認された。検体採取時期は 2013 年 12 月 1 株, 2014 年 2 月 1 株, 同年 3 月 2 株であった (Table 1)。耐性ウイルスが検出された年齢構成は 1 歳 1 名, 3 歳 2 名, 76 歳 1 名であった。

## 2. オセルタミビル投与状況

調査対象者のオセルタミビル投与日数と耐性ウイルスの検出状況を Table 2 に示した。調査対象者 41 名中, オセルタミビル未投与は 33 名であった。そのうち 1 名から分離された AH1pdm09 ウイルス株は H275Y 耐性変異を有していた。オセルタミビル投与後に検体が採取された調査対象者は 41 名中 8 名であった。8 名のうち 5 名は投与後 3 日以内に採材が行われていて, いずれも H275Y 耐性変異は認められなかった。一方で 5 日間投与後に採材された 3 名は H275Y 耐性変異が確認された。

## 3. オセルタミビル耐性ウイルスが検出された薬剤投与前の小児患者の疫学情報

本事例の患児 (3 歳: 男児) は, 欧州から帰国後, 2013 年 12 月 20~24 日まで札幌市に滞在していた。その後, 三重県へ帰省し, 同年 12 月 25 日に A 市のインフルエンザ定点医療機関 (小児科) を受診した。本患児がインフルエンザ症状を発症する前に, 父母に発熱症状が確認されており, 家族内感染が疑われた。父親についての詳細な検査情報はないが, 母親は患児が発症する前日に医療機関を受診し, インフルエンザ迅速診断キットにより A 型インフルエ

ンザと診断されたが AH1pdm09 への罹患の有無は不明である。なお, 母親にはリレンザが処方されていた。その後, 本患児は受診しておらず予後は不明である。

## 4. NA 阻害薬に対する感受性試験

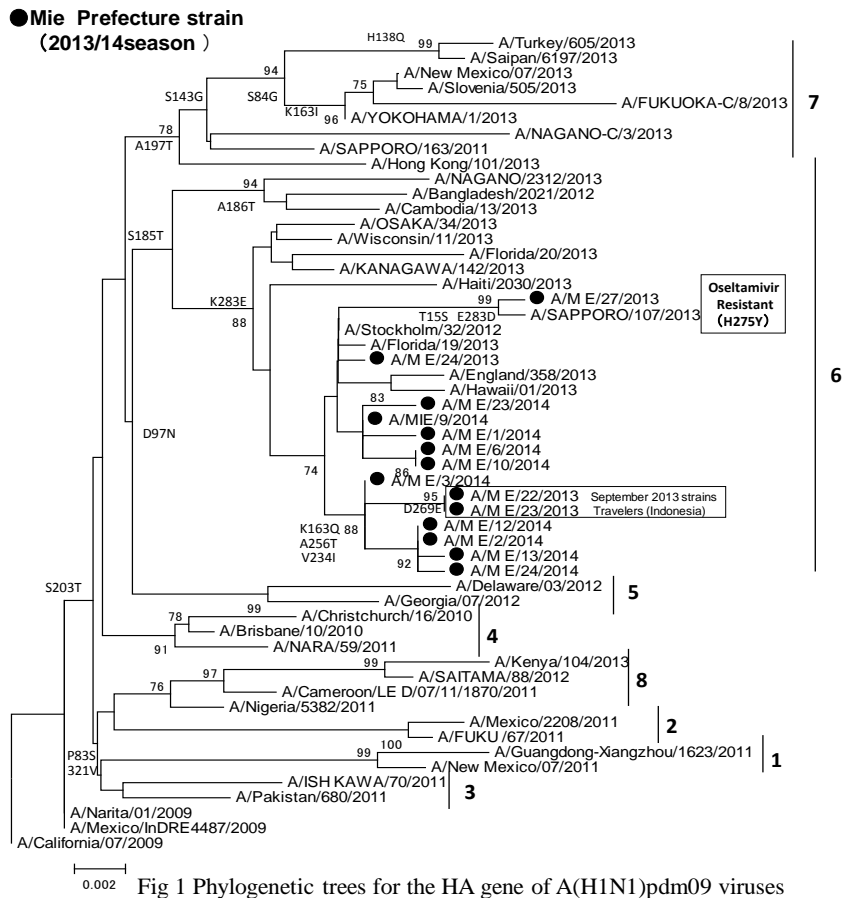
2013 年 12 月に本県でオセルタミビル投与前の小児患者から分離したオセルタミビル耐性ウイルス株 (A/Mie/27/2013 株) を国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターへ送付し NA 阻害薬に対する感受性試験を実施した。オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビル, ラニナミビルに対する IC<sub>50</sub> 値は各々 364.80nM, 16.52nM, 0.18nM, 0.93nM で, 感受性参照株と比較してオセルタミビルおよびペラミビルに対する感受性が著しく低下していたが, ザナミビルおよびラニナミビルに対しては感受性を保持していた。

## 5. オセルタミビル耐性ウイルスの抗原性解析

オセルタミビル投与前の小児患者から分離した A/Mie/27/2013 株について HI 試験による抗原性解析を実施したところ, 抗 A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 フェレット血清 (ホモ価 640) に対して HI 価 320 を示し, A/Mie/27/2013 株の抗原性は 2009/10~2012/13 シーズンのワクチン株 A/California/7/2009 (AH1N1pdm09) に類似していた。

## 6. HA および NA 遺伝子系統樹解析

2013/2014 シーズンに本県で分離された AH1pdm09 の 14 株について HA 遺伝子系統樹



解析を実施した。これらの株は全て、HA タンパク質に D97N, S185T のアミノ酸置換を持つクレード 6 に分類された (Fig 1)。オセルタミビル耐性ウイルスである A/Mie/27/2013 株は、2013/14 シーズン初期 (2013 年 9 月) にインドネシアへ渡航歴のある患者から分離<sup>13)</sup>された感受性株 (A/MIE/22/2013 株, A/MIE/23/2013 株) の HA アミノ酸と比較すると、3 箇所 (アミノ酸番号:15, 269, 283) が異なっていた。

さらに A/Mie/27/2013 株の NA 蛋白は、札幌市のオセルタミビル耐性ウイルスと同様に V241I, N369K, N386K の変異<sup>5)</sup>を有しており、NA 遺伝子系統樹解析 (Fig2) からは、札幌市および三重県のオセルタミビル耐性ウイルスは米国 (ルイジアナ州, ミシシッピ州) のオセルタミビル耐性ウイルスとは NA 遺伝子配列が異なっていた。

### 考 察

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。2008/09シーズンには、北欧

が由来とされるAH1ソ連型インフルエンザの表面蛋白にアミノ酸変異が生じ<sup>14,15)</sup> オセルタミビルに対して薬剤耐性を獲得した耐性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った。日本国内におけるオセルタミビル耐性ウイルスの検出頻度は前シーズン (2.6%) と比較し、2008/09シーズンは99.6%へと劇的に増加した<sup>16)</sup>。

2009年に発生したAH1pdm09についても、同様に薬剤耐性を獲得したウイルスのヒトからヒトへの急速な伝播が起きる可能性がある。現在のところ、2008/09シーズン以降の国内でのオセルタミビル耐性AH1pdm09の検出率は、僅かながら増加傾向 (0.5%~1.8%) にある<sup>2,6)</sup>が、実際に2011年には、豪州で検出されたAH1pdm09のうち、191人中29例 (15.2%) がオセルタミビル耐性ウイルスで、大半がオセルタミビル未投与 (96.6%) であったことが報告<sup>18)</sup>されており、国内外でオセルタミビル耐性ウイルスの動向が注視され、監視が継続的に行われている。

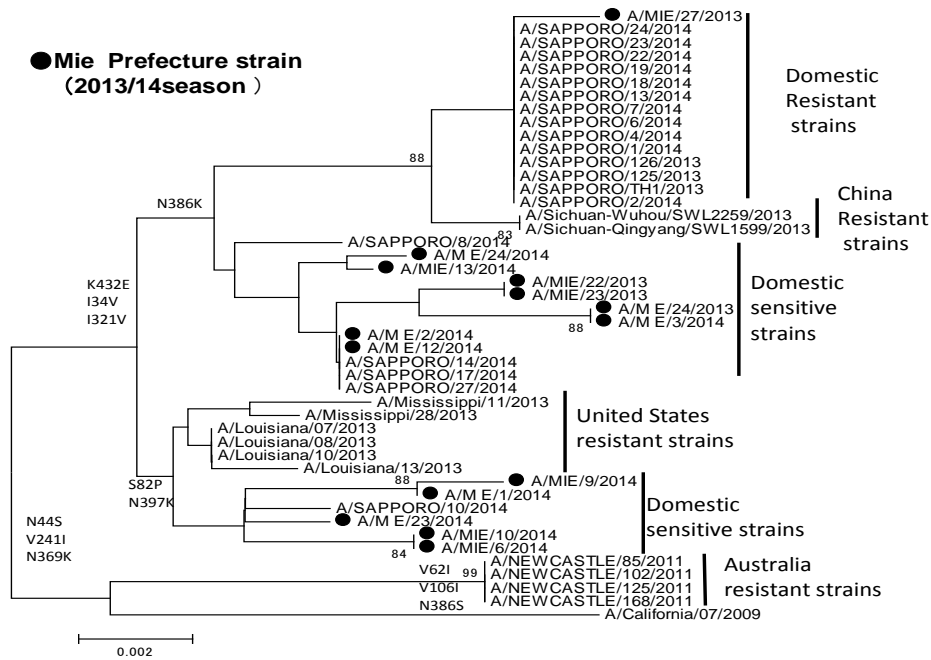


Fig2. Phylogenetic trees for the NA gene of A(H1N1)pdm09 viruses

2013年には札幌市が短期間に流行し、全国的にオセルタミビル耐性を強化し、

例の患児および家族が札幌市に滞り、本患児から検出されたウイルスの遺伝子配列が札幌市のウイルスと完全に一致していたことなどの疫学的リンクから、札幌市でオセルタミビル耐性ウイルスに感染し、三重県に持ち帰ったケースと考えられた。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国内集計によると、我々が本調査を実施した同時期の2013年9月（第36週）から2014年4月（17週）までに2470株中104株（4.2%）のオセルタミビル耐性ウイルスが報告されている<sup>17)</sup>。これまでの国内のオセルタミビル耐性ウイルスに関する報告事例の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<sup>19)</sup>。過去に本県で小児から検出された2株<sup>7)</sup>についても予防投与あるいは治療投与後の採取検体から検出された事例であった。今回、H275Y耐性変異が認められた4株中3株については治療投与後の採取検体からの検出であった。なお本事例の1株は検体採取前に抗インフルエンザ薬の投与は受けておらず薬剤により患児の体内でオセルタミビル耐性ウイルスが選択的に生き残った可能性は否定される。我々が2009年以降に

数は24名、耐性は2名であった。

我々が以前、実施した調査では薬剤投与4日目の患者（1名）からH275Y耐性変異ウイルスと感受性ウイルスの混在（H275H/Y）を確認した<sup>7)</sup>。薬剤投与5日以上患者（4名）ではH275Y耐性変異ウイルスが優位となる傾向がみられ、さらなる症例の蓄積による考察が必要であると思われる。

一方、広島県で2014年3月に検出されたAH1pdm09はH275Y耐性変異に加え、I223Rの耐性変異が確認された国内初の二重耐性変異ウイルスであった。NA阻害薬に対する感受性試験ではオセルタミビルおよびペラミビルに高い耐性を示し、さらにザナミビルおよびラニナミビルに対しても感受性が低下していた<sup>6)</sup>。

2009年の発生当初は、若い年代でウイルス性肺炎が多く見られ、小児では基礎疾患のないものでも一部重症化する例が見られた<sup>3)</sup>が、他国と比較すると我が国において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<sup>20)</sup>。治療方針の決定のためにもAH1pdm09の流行動向および薬剤耐性ウイルスの動向には注目する必要がある。今後、薬剤耐性ウイルスの出現状況を注意深くモニタリングし、医療機関におけ

る投与薬剤の選択戦略を検討するための情報提供をしていきたいと考えている。

謝辞：本研究を行うにあたり，検体採取を担当された医療機関の諸先生方および関係各位に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team : Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N Engl J Med*, **360**, 2605-2615 (2009).
- 2) Takashita E, Fujisaki S, Kishida N et al : Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza Other Respir Viruses* **7**:1390-1399 (2013).
- 3) 国立感染症研究所感染症情報センター：パнде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).
- 4) Tashiro M, McKimm-Breschkin JL, Saito T et al : Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. *Antivir Ther* **14**, 751-761 (2009).
- 5) Takashita E, Ejima M, Itoh R et al : A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* **19**:pii: 20666 (2014).
- 6) 高下恵美, 江島美穂, 藤崎誠一郎 他：日本国内で初めて検出された H275Y/I223R 二重耐性変異をもつノイラミニダーゼ阻害剤耐性インフルエンザ A(H1N1)pdm09 ウイルス, 病原微生物検出情報, **35**, 176-177 (2014).
- 7) 矢野拓弥：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 ウイルスの検討小児感染免疫, **25**, 289-296 (2013).
- 8) 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)
- 9) 矢野拓弥, 大熊和行：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**：305-310(2011).
- 10) 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) 平成 24 年 3 月.
- 11) 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.
- 12) 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) .
- 13) 矢野拓弥, 前田千恵, 赤地重宏 他：2013 年 9 月に分離された A(H1N1)pdm09 ウイルスの性状—三重県, 病原微生物検出情報, **34**, 343-345 (2013).
- 14) Marie-Anne Rameix-Welti, Vincent Enouf, Frédérique Cuvelier 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).
- 15) Jesse D. Bloom, Lizhi Ian Gong, David Baltimore et al : Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science* **328** : 1272-1275 (2010).
- 16) Ujike M, Shimabukuro K, Mochizuki K et al : Oseltamivir-resistant A/H1N1 viruses during the 2007-2009 influenza seasons, Japan. *Emerg Infect Dis* **16** : 926-935 (2010).
- 17) 国立感染症研究所：抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランス <http://www.nih.gov/jp/niid/ja/influ-resist.html>
- 18) A. C. Hurt, K. Hardie, N. J. Wilson et al : Characteristics of a Widespread Community Cluster of H275Y Oseltamivir-Resistant A(H1N1)pdm09 Influenza in Australia. *J Infect Dis* **206** : 148-157 (2012).
- 19) 米田正樹, 井上ゆみ子, 岡山 明子 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** : 284-289 (2011).
- 20) Sugaya N, Shinjoh M, Mitamura K 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** : 288-94 (2011).

## **Anti-influenza drug-resistant A(H1N1)pdm09 virus detected from a child who was suspected familial infection but had not been administered with oseltamivir**

Takuya YANO, Emi TAKASHITA, Miho EJIMA, Seiichirou FUJISAKI, Kazuya NAKAMURA, Hajime KUSUHARA, Shigehiro AKACHI,  
Takashi KOBAYASHI and Takamichi NISHINAKA

**Keywords:** oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09, H275Y resistant A(H1N1)pdm09,  
drug susceptibility test

When the oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 viruses(oseltamivir-resistant viruses) in Mie prefecture between September 2013 and April 2014 were investigated, 4 resistant viruses were detected among of 41 cases(9.8%). Among 4 resistant viruses, one case found was from one child patient before drug administration. In this case, this child patient and the family stayed at Sapporo city during endemic spread of multiple oseltamivir-resistant viruses in Sapporo city. The both gene sequences in oseltamivir-resistant viruses detected from Sapporo city and Mie prefecture were coincided. Therefore, the resistant viruses found in Mie prefecture was infected with oseltamivir-resistant viruses in Sapporo and then were brought back to Mie prefecture. It may be useful, for considering the selective strategy for drugs to be given, to conduct careful nationwide monitoring on evolution state for oseltamivir-resistant viruses and provide information rapidly to medical institution.