

綜

説

新潟県の高齢者施設と一般病院・医院における アマンタジン耐性インフルエンザウイルスの分子疫学

新潟大学大学院医歯部総合研究科, 国際感染医学講座公衆衛生学分野

鈴木 宏・斎藤 玲子・坂井 貴胤・押谷 仁

新潟大学医学部附属病院薬剤部

増田 寛樹・佐藤 博

新潟県保健環境科学研究所ウイルス科

西川 眞

Molecular Epidemiological Study of Amantadine Resistant Influenza Viruses in Enursing Homes and Clinics in Niigata

Hiroshi SUZUKI, Reiko SAITO,

Takatugu SAKAI and Hitoshi OSHITANI

Division of Public Health, Department of Infectious

Disease Control and International Medicine,

Niigata University Graduate School of

Medical and Dental Sciences

Hiroki MASUDA and Hiroshi SATO

Division of Pharmacy, Niigata University Medical Hospital

Makoto NISHIKAWA

Section of Virology, Niigata Prefectural Laboratory for

Health and Environmental Control

Reprint requests to: Hiroshi SUZUKI
Division of Public Health Department of
Infectious Disease Control and International
Medicin, Niigata University Graduate School
of Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り1-757
新潟大学大学院医歯部総合研究科, 国際感染医学講
座公衆衛生学分野 鈴木 宏

Abstract

Amantadine (Am) is effective in treatment and prevention of human influenza A virus infections, although treated individuals may excrete resistant viruses. However, their impacts have been incompletely defined.

To detect Amantadine resistant influenza A virus strains, we have developed a PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analyses for nasopharyngeal swabs. We could detect 5 resistant viruses (3.3%) in 152 isolates from children prior to the treatment in the 1999/2000 season, indicating that circulation of drug-resistant viruses was not so high in the community even with excess use of Am. Furthermore, we investigated the clinical consequences of Am resistance viruses associated with therapy in children, and our results suggest that one third of treated children excrete resistant viruses, and that they show a reduction of a fever on day 3, but a recrudescence of fever on day 5. In nursing homes, we found that resistant influenza virus strains were circulating at a high frequency in Japan.

Am resistant strains after treatment in two seasons from 1999 to 2001 were found higher in H3N2 than H1N1. Predominant genotype of resistant strain was Ser-31-Asn in H3N2 and Val-27-Ala in H1N1, showing different diversity of amino acid substitution in H3N2 and H1N1.

Thus, we request that a nationwide monitoring system be established to survey the appearance of resistant influenza A virus in Japan.

Key words: Influenza viruses, amantadine, antiviral drugs, resistant viruses

はじめに

インフルエンザに関する予防・治療は、この数年間でめまぐるしいほどの変化が起こった。ワクチンは高齢者への接種を制度化され、迅速診断法の導入と相まって2種類の抗インフルエンザウイルス剤が登場してきた¹⁾²⁾。ここでは、特に抗インフルエンザA型ウイルス剤であるアマンタジン(Am)の効果と本薬剤の耐性株の問題について述べる。

インフルエンザウイルス

ウイルス学的にはオルソミクソウイルス(Orthomyxoviridae)科に属する一本鎖のRNAウイルスであり、A、B、Cの3型がある。流行と関連するのは主にA、Bの二つである。ウイルス遺伝子はmRNAと相補的なマイナス鎖RNAで分節構造を持ち、コードする蛋白毎にA型とB型で

は8本、C型では7本の分節を形成している。感染細胞ではこれらの分節が各自の蛋白を独立して生産され、再集合して最終的な仔ウイルスが産生される。

A型ウイルス表面には感染・防御に関係する赤血球凝集素(HA)とノイラミニダーゼ(NA)の二つがあり、抗原性の違いによりHAには15種類の亜型(H1~H15)、NAには9種類の亜型(N1~N9)が現在まで報告されている。これらの組み合わせからH1N1(スペインかぜ、ソ連かぜ)、H3N2(香港かぜ)等に分類される。

抗ウイルス剤としての塩酸アマンタジン (シンメトリル®)

歴史的には、1950年代に本薬剤はA型インフルエンザに対する抗ウイルス剤として誕生した。その後パーキンソン病に効果が示され、この治療薬としても使用された。本邦では後者での適応がな

されてきたが、新型インフルエンザの発生も危惧され、厚生省は1998年末にインフルエンザへの治療薬として追加承認した。しかし、薬価が安く、手軽に使われ、服用後に容易に耐性株が発生することもあり、耐性株の大量発生が危惧され、その実態を把握する必要がある。

1. 耐性株の性状

1) 作用機序

A型のインフルエンザウイルスはエンドサイトーシスにより細胞内の酸性のエンドソームに取り込まれる。その後、H⁺イオンがイオンチャンネルで、Type IIIに分類される膜蛋白であるウイルスのM2蛋白部位を介してウイルス粒子に入り内部のpHが低下する。これにより、M1と遺伝子複合体 (ribonucleoprotein: RNP) の結合をゆるめ、RNAをパッケージされた状態となると同時にHA蛋白が膜融合を起こし、粒子内のRNPは細胞内に放出されウイルスの合成が開始される。

この薬剤の作用機序はM2蛋白のイオンチャンネルのH⁺イオン通過を阻止し、酸性化を抑え、それにより、ウイルスの脱核を阻止することによる。塩酸アマンタジンはリマンタジンと同様にA型の予防・治療薬である。

2) 耐性株の発生機序

耐性機序はType IIIに分類され、H⁺イオンのイオンチャンネルでもあるM2膜蛋白の一部のアミノ酸、26, 27, 30, 31番のコドンの1塩基置換による³⁾。野外の感受性株と耐性株が1万:1との割合で存在し、本剤投与によりselectionされ、耐性株優位へと移行し、結果的には耐性株と判定される。この現象は投与後約1/3で24-48時間後と短時間に見られる。なお、塩酸アマンタジン耐性株はリマンタジンにも相互に耐性である^{1) 2)}。

3) 耐性株の検出法の開発

耐性株の検出法として、ELISA法、TCID₅₀法、ブラック法、M2蛋白部位のシーケンシングにより行われている⁴⁾。我々は臨床的にインフルエンザと診断されたFlu患者の咽頭拭い液を用いウイルス分離を行った。その後、分離ウイルスをAm添加と非添加培養液 (コントロール) で継代し、

TCID₅₀で100倍の差以下を耐性株とした (phenotype)。ここで耐性株と判定された株について、オートシーケンサーによりM2部位のアミノ酸変異部位を特定化し、耐性株と確定した (genotype)。

M2膜蛋白部位の変異を特異的にしかも迅速に検索する方法を開発した⁵⁾⁻¹⁰⁾。それぞれのアミノ酸変異部位 (27, 30, 31) に合致するような nested PCR と3種類の制限酵素を組み合わせた PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 法により、M2部位のアミノ酸変異部位を簡易に識別も加味して耐性株を決定した (図1)。また、同PCR産物をオートシーケンサーによりM2部位のアミノ酸変異部位も並行して確認した。この方法には、患者咽頭拭い液から直接と、分離ウイルス株からの二つの方法も検討し、同様な結果が得られた。

以上、TCID₅₀法、PCR-RFLP法、オートシーケンサーによるM2部位のアミノ酸変異部位を特定化し、耐性株を確定した。

4) 市中における耐性株の発生

海外では家族内、学校、高齢者施設での報告はあるがフィールドでの報告は少なく、発生頻度は低いとされる。市中での耐性株は日本も含めた世界の43カ国のフィールドから分離されたウイルスの耐性株の検出頻度は2017株中16株 (0.8%) と極めて低い率であった。我々の1993-99年の6シーズンの15株では無かった⁵⁾。

1999/2000シーズンの試算では210万人分 (100 mg×5日分/人) として全国のインフルエンザ患者の30%前後と、世界で類を見ない大量の使用となり、耐性ウイルスの出現が危惧された (図2)¹¹⁾。新潟県内の小児科医へのアンケート調査では61.5%、全国での調査でも30-40%と、我々の試算を裏付けていた。医院・クリニックにおける耐性株発生状況の調査では、1999/2000シーズンの初診時耐性株検出頻度は3.3% (5/152) と異常な上昇傾向が見られたが、2000/2001シーズンは0% (0/77) であり、Am処方量の相対的減少に関連があると思われた。1999/2000シーズンの本邦の大量で見秩序に近い使用は新型インフルエンザ流行時

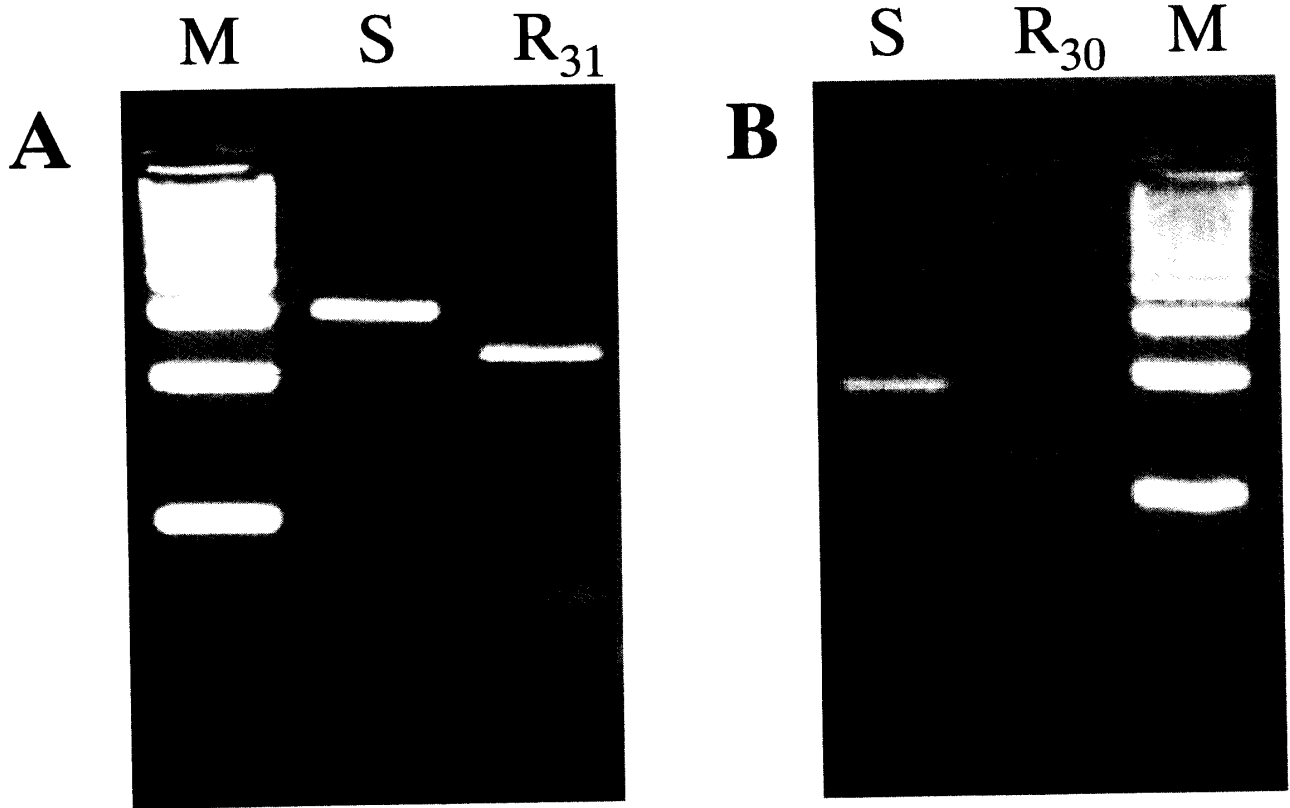


図1 PCR-RFLP 法によるアマンタジン耐性株, 特に genotype の特定化法
 A. Sca I の制限酵素を用いた31番目のアミノ酸変異株
 B. Hha I の制限酵素を用いた30番目のアミノ酸変異株
 R: 耐性株 S: 感受性株 M: マーカー

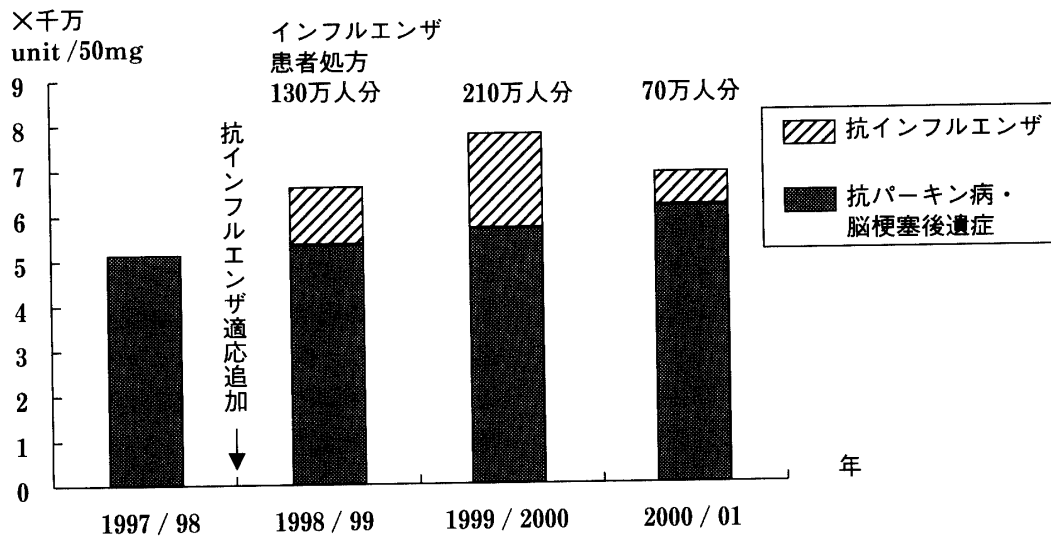


図2 アマンタジン (Am) 処方数年次推移

表1 1998/99年高齢者施設別 PCR-RFLP 法によるアマンタジン耐性インフルエンザ株出現頻度⁶⁾

施設 (入所者数)	アマンタジン使用数		耐性株	/	PCR 陽性者	(%)
	抗 Flu	抗 Parkinson				
A (95)	5	1	3	/	15	(20.0)
B (93)	3	1	2	/	11	(18.2)
C (94)	62	0	4(1)*	/	18	(22.2)
D (160)	34	0	18(5)*	/	54	(33.3)
Sub total	104	2	27(6)*	/	98	(27.6)
E (88)	0	1	3	/	26	(11.5)
F (112)	0	5	3	/	9	(33.3)
G (68)	0	3	1	/	4	(25.0)
H (50)	0	1	0	/	4	(0.0)
Sub total	0	10	7	/	13	(16.3)

Flu: インフルエンザ, Parkinson: パーキンソン病

*アマンタジン内服後に耐性株出現, **有意差なし

での本剤の使用への貴重な情報となると思われる。このことから、我々の経験からは、大量使用にもかかわらず思ったより耐性株発生は無かったことになる。しかし、この結論にはもう少しの検証が必要と思われる。

Am が大量に使用された1999/2000シーズンにおける新潟市内の一クリニックにおけるインフルエンザ患者からの治療前の Am 使用前のウイルス分離株を用いて耐性株の動向を検討した。Am 添加と非添加培養液で継代し、TCID₅₀において、Am 非添加による株の TCID₅₀は大きな変化は無く、ほぼ一定に推移した。しかし、Am 添加による株の TCID₅₀は患者発生のピークから3週遅れて最大値に達し、その後減少した。なお、耐性株はピーク時とその前に検出された。臨床面からは、流行初期は本薬剤の効果はあったが、流行後期は効果があまり無かったとの印象があるとされ、我々の Am 添加による株の TCID₅₀の推移と相関し、耐性株との判定には至らなかったが、in vivo では耐性株として挙動した可能性を示唆していると思われた。

5) 高齢者施設における耐性株の発生

我々の調査した高齢者施設においては、発売前でも11株中1株(9%)の耐性株が見られ、Am

が FluA 適用となった1988-99に分離された15株中7株と約半数が耐性株であり、その患者の大部分は Am 服用しておらず、施設内感染が示唆された⁵⁾。

更なる調査では、Am を抗パーキンソン病剤として投与している高齢者施設と抗インフルエンザとして主に投与した施設を比較し、耐性の発生頻度は有意さを認めなかった(16.3%, 27.6%) (表1)⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾。このことより、施設内で Am を使用しておれば常に耐性株の発生の可能性があり、使用には注意が必要となる。耐性株の感染力は感受性株と同等であり、英国のワクチン委員会は施設ないしは家庭内で Am の予防と治療投与を同時に行うべきではないと勧告している¹⁾²⁾。

6) 耐性株の治療効果への影響

小児 A 型インフルエンザ感染に対する Am 治療を発病48時間以内に投与し、Am 投与2日目(第3病日)に平熱に戻る解熱効果を示したが、耐性株陽性患者においては第4病日に熱の再上昇と遷延傾向が昨年と同様に認められた(図3)。なお、耐性株の出現は他の報告と同様に投与48-72時間で投与患者の約30%で見られた⁷⁾。

7) 耐性株の性状

薬剤耐性機序にはイオンチャンネルを形成して

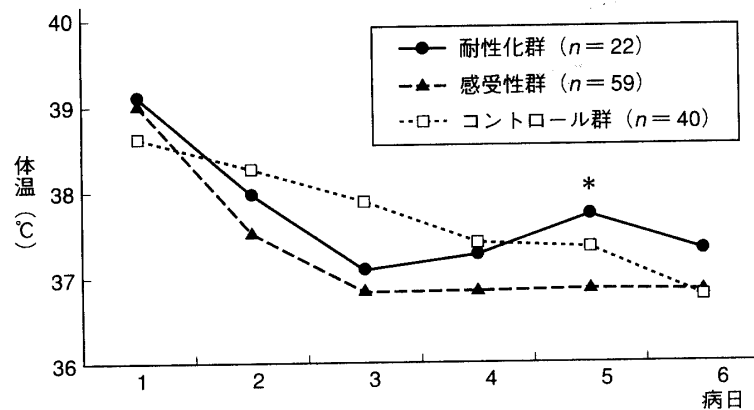


図3 1999/2000年小児外来におけるインフルエンザウイルスのアマンタジン耐性化と解熱効果³⁾

*耐性化群対感受性群, $p < 0.05$

いる M2 protein の 4 箇所の変異と関連する。耐性株においては株毎に 1 カ所の変異を示し、26番は (Val→Ala または Val→Thr), 27番は (Val→Ala または Val→Thr), 30番は (Ala→Thr または Ala→Val), 31番は (Ser→Asn または Ser→Arg) の 4 種類の変異部位が臨床株の検索から報告されている⁴⁾⁵⁾⁸⁾。この特定には M2 部位を PCR で増幅後上で述べた部位を特異的に切断する酵素を用いる方法が行われている。

これまでの文献的な検索と我々の研究から 31 番目のアミノ酸が変異が、一番高頻度にみられる事が解った。しかし、2 シーズンの型別の耐性株出現頻度は、H1N1 は 22.7% (5/22) と 19.0% (4/21), H3N2 は 32.2% (19/59) と 50.0% (1/2) と両シーズンで H1N1 でやや低い出現傾向が見られた。更には、両シーズンで H1N1 は Val-27-Ala, H3N2 は Se-31-Asn 優位と M2 蛋白のアミノ酸変異部位が異なっていた。以上より、H1N1 と H3N2 では耐性化に差異が存在することが示唆された。なお、今シーズンで H1N1 の 26 番変異株を初めて検出した。

2. 副反応

いらつき、不安感、集中力低下などの神経系の副反応が多く、次いで吐き気や食欲不振などの消化器系の副反応がある。我々の小児 A 型インフル

エンザ感染に対する投与には、投与群では副反応出現頻度は 14.1% に認められた⁷⁾。

3. 今後の Am 使用

インフルエンザ治療には Am 以外に、ノイラミニダーゼ阻害剤の 2 種類の抗インフルエンザウイルス剤がある。後者はインフルエンザの A 型と B 型両者効果があり、副反応や耐性株発生は Am と比較し少ない長所を持つが、薬代は 10 倍と高価である。治療効果は同じであり、今後ノイラミニダーゼ阻害剤の使用量が増加すると思われる。しかし、新型インフルエンザに於いてはワクチン供給は間に合わず、抗ウイルス剤の登場となる。製造量、保存の容易さ、薬代等から副作用はさておき、Am の使用が考えられる。心配される市中の耐性株増加は我々の研究からこれまで思っていたほどではなく、候補としては依然として有力である¹¹⁾。しかし、更なる検討が強く望まれている。

本研究は「新潟大学医学部研究助成金 (有任基金)」, 「平成12年度厚生科学研究補助金 (新興・再興感染症研究事業)」の助成を受けた。

共同研究者

この研究にご協力いただいた佐藤 勇, 佐野康子, 笹崎義博, 佐藤雅久, 庄司義興, 常山佐世子, 長岡保健所 (上村 桂), 水原郷病院 (寺田一郎), サンプラザ長岡

(亀山宏平), とやの中央病院(斎藤謙吉), 恵風園, おもと園, 第2にいがた園, にいがた園, はぐろの里(家田俊一郎), 関川愛広苑(小熊勇司), 女池南風苑(大西昌之), やすだの里(斉藤 徹), デンカ生研の先生方やスタッフの方々, また本教室の佐藤真由美, 渡辺明美, 相田志保さんに深謝いたします。更には, 県内の小児科の先生方にはアンケートに快くお答え戴き, 厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nicholson KG (editor). Managing influenza in primary care. Blackwell Science, UK. 1999.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention: Prevention and control of influenza: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). MMWR; 50: RR-4 2001.
- 3) Holsinger LJ, Nichani D, Pinto LH and Lamb RA: Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. J Virol 68: 1551-1563 1994.
- 4) Klimov AI, Rocha E, Hayden FG, Shult PS, Roumillat LF and Cox NJ: Prolonged shedding of amantadine-resistant influenza A viruses by immunodeficient patients: detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. J Infect Dis 172: 1352-1355 1995.
- 5) Masuda H, Suzuki H, Oshitani H, Saito R, Kawasaki S, Nishikawa M and Satoh H: Incidence of amantadine-resistant influenza A viruses in sentinel surveillance sites and nursing homes in Niigata, Japan. Microbiol Immunol 44: 833-839 2000.
- 6) 斎藤玲子, 増田寛樹, 押谷 仁, 鈴木 宏, 川崎 聡, 佐藤 博: 新潟県内高齢者施設における A 型インフルエンザウイルスのアマンタジン耐性株 (Ser-31-Asn 遺伝子型, genotype) 出現頻度. 感染症雑誌 74: 648-651 2000.
- 7) 佐藤 勇, 斎藤玲子, 佐野康子, 笹崎義博, 佐藤雅久, 庄司義興, 常山佐世子, 坂井貴胤, 増田寛樹, 鈴木宏: A 型インフルエンザ感染に対するアマンタジン治療の検討. 外来小児学会誌 3: 255-259 2000.
- 8) Saito R, Oshitani H, Masuda H and Suzuki H: Detection of amantadine-resistant influenza A strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. J Clin Microbiol 40: 84-88 2002.
- 9) 鈴木 宏, 斎藤玲子, 押谷 仁, 増田寛樹: 4. ワクチン, 3) インフルエンザウイルス (ワクチン接種と抗インフルエンザウイルス剤). 化学療法の領域. 16: S-2, 315-321 2000.
- 10) 斎藤玲子, 押谷 仁, 鈴木 宏: アマンタジン耐性インフルエンザウイルス. 特に本邦のアマンタジン耐性株出現状況. 臨床検査 45: 884-887 2001.
- 11) Suzuki H, Saito R and Oshitani H: Excess amantadine use and resistant viruses. Lancet 358: 1910 2001.