

インフルエンザウイルスの アマンタジン耐性株の実態に関する調査研究

佐藤 宏康 斎藤 博之 安部真理子 原田誠三郎*

A型インフルエンザウイルス感染症の治療薬として、抗ウイルス剤アマンタジンが使用されている。アマンタジンは安価で効能・効果も高いことも明らかとなってきた。しかし、治療投与後に耐性株が高率に出現することが懸念されている。アマンタジンが抗ウイルス剤として認可されて間もないことなどから、一般外来の臨床現場における耐性株の浸淫実態については殆ど知られていない。

2000/2001、2001/2002シーズンに秋田県内で検出された一般外来患者由来のA型インフルエンザウイルス232株についてアマンタジンに対する耐性株の出現状況をPCR法を用いて調査した。検出された耐性株はいずれもA香港型で3株、検出率は1.29%で、耐性株の検出頻度は危惧されるほど高率ではなかった。しかし、今後も治療薬として使用されることが推定されることから、一般外来における耐性株の監視は今後とも必要と考えられる。

キーワード：A型インフルエンザウイルス、アマンタジン耐性株、抗ウイルス剤、PCR法

I はじめに

アマンタジンは1960年代に開発され、米国ではインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス剤として広く使用されてきた。しかし、我が国での抗ウイルス剤としての使用認可は1998年である。アマンタジンは安価で効能・効果も高いことからその使用量は急速に増大している。菅谷はその予防効果が大きいことを報告している¹⁾。

本来アマンタジンは予防投与が効果的な薬であり、既に感染している患者に対して治療薬として用いる場合には耐性株の出現が危惧されてきた²⁾。

一方、アマンタジンを治療薬として施設内等で使用した場合、高率に耐性株が出現するとの報告もある³⁾。インフルエンザ流行シーズン中に耐性株が高頻度に出現した場合は当然抗ウイルス剤として使用できない事態が危惧される。一般外来の臨床現場で検出された分離株のうち何%が耐性を獲得しているのか、また、耐性株は増加する傾向にあるかなどについて、一般外来の臨床現場から分離された株について耐性獲得状況を監視していく必要があると考えられる。

我々は、感染症発生動向調査で外来患者の咽頭拭い液から分離同定されたA型インフルエンザウイルスについて、耐性株の出現頻度を調査したのでその成績について報告する。

II 材料及び方法

1. 分離材料の採取と使用ウイルス分離株

分離材料の採取は感染症発生動向調査、病原検体定点の県内8医療機関、及び流行時に検体採取を依頼した秋田市内の3診療所で採取した。全ての検体は外来の診療中に採取され、いずれの患者もアマンタジンの事前投与は受けてない。

ウイルス分離にはMDCK細胞と10日孵化鶏卵を併用した。検出された外来患者由来のA型インフルエンザウイルスは2000/2000シーズンはA香港型32株、Aソ連株50株計82株、2001/2002シーズンはA香港型92株、Aソ連株58株計150株の合計232株である。

2. 耐性株検出方法

アマンタジン耐性の判定方法は、M2蛋白コード部分をRT-PCRにより増幅したDNA断片を制限酵素Sca Iにより切断することによるPCR-RFLP法³⁾により行った。使用したプライマー配列はフォワード側が5' TCCTAGCTCCAGTGCTGGTC3'、リバーズ側が5' GAAGAACCAATATCAAGTGCAAGATCCCAATAGTA3'で、これにより152bpのDNA断片が増幅される。図1に示すとおり、リバーズ側のプライマーの3'末端から数えて3番目と4番目にわざとミスマッチを導入することで、通常のアマンタジン感受性株ではSca I切断配列(AGTACT)が生じるようにデザインされている。アマンタジン耐性株では、判定部分がAATACTとなるため、Sca Iの影響を受けなくなる。従って、図2に示すよう

*現 大館鹿角健康福祉センター

図1 アマンタジン感受性株と耐性株の塩基配列の比較

原法のプライマー配列→ TCCTAGCTCCAGTGTGCTC

H3S. seq 1: GTGCAGGCAATGAGAACCGTTGGGACTCATCCTAGCTCCAGTACTGGTCTAAGAGATGAT 60

H3R. seq 1: A..... 60

H1S. seq 1:G..A.....T..C.....G..A..A..... 60

修正したプライマー配列→ TCCTAGCTCTAGCGCTGCTC

H3S. seq 61: CTTCTTGAAAATTGACACCTATCAGAAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAG 120

H3R. seq 61: 120

H1S. seq 61: ..C.....G..... 120

Sca I (AGTACT)

原法のプライマー配列→ TACTATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGTTCTTC

H3S. seq 121: TGACCCGCTTGTTGTTGCTGCGAGTATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCT 180

H3R. seq 121:A..... 180

H1S. seq 121: ...T..T.....C..A.....AG.....TG.....C.....A.. 180

修正したプライマー配列→ TACTGTTGGGATTGTGCACCTGATATTGTGGTTTCATC

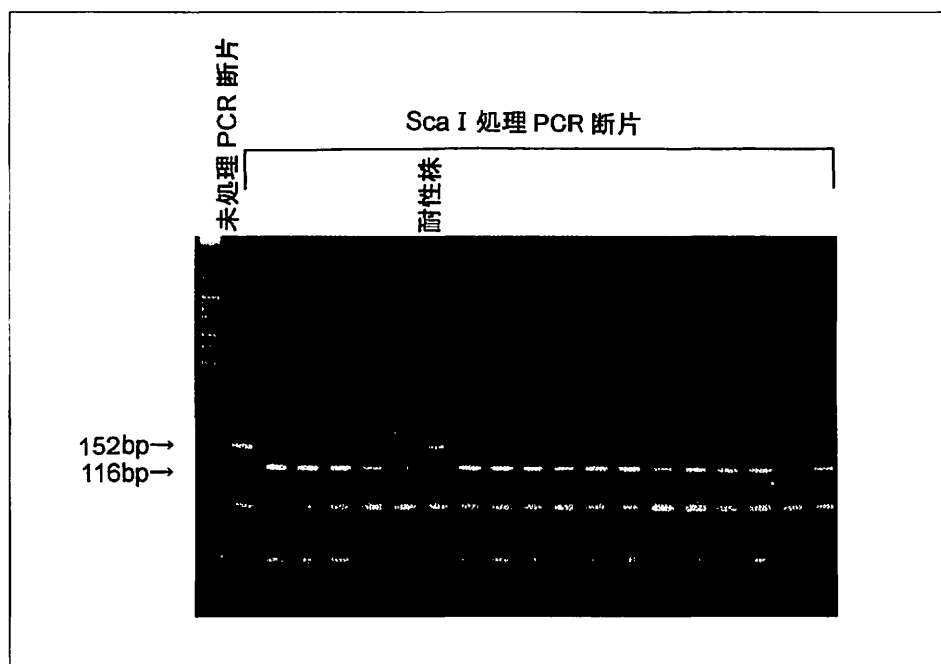
H3S. seq 181: TGATCGTCTTTTTTCAAATGCATCTATCGACTCTTCAAACACGGCCTGAAAAGAGGGCC 240

H3R. seq 181:A..... 240

H1S. seq 181:C.....C...A...T...TA...T.....TT..A..... 240

H3S.seqはA香港型感受性株、H3R.seqはA香港型耐性株、H1S.seqは2001/2002シーズンのAソ連型感受性株の塩基配列を示す。Sca I 判定領域(囲み線部分)を含むリバース側プライマーの配列は実配列であり、PCRに使用するのは相補鎖配列(本文参照)である。

図2 PCR-RFLP法によるアマンタジン耐性判定の実例



PCR増幅断片をSca I で処理した後、15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、切断を受けないものを耐性株と判定した。

にアマンタジン感受性株では、152bpのPCR増幅断片が Sca I 処理によって切断を受けて短くなり116bpとなって検出されるが、感受性株では切断を受けないため未処理の断片と同じ152bpのままで検出される。

2001/2002年シーズンに分離されたAソ連型については塩基配列の変異が大きく、原法のPCRプライマーでは増幅できなかったため、分離株の塩基配列から新たにプライマーを設計した。図1に示すとおり、フォワード側で2ヶ所、リバース側で5ヶ所（Sca I 判定領域を除く）の塩基を修正したところ問題無く増幅できたため以後はAソ連型についてのみ修正プライマーを用いた。

III 結果及び考察

2000/2001、2001/2002シーズンに秋田県内で検出された外来患者由来のA型インフルエンザウイルス232株についてアマンタジンに対する薬剤耐性株の出現状況を斎藤らのPCR法を用いて調査した結果を表1に示した。

表1 アマンタジン耐性株の検出状況

シーズン	分離ウイルス株		耐性株数		検出率 (%)
	総数	A香港型 Aソ連型	A香港型 Aソ連型		
2000/2001	82	32 50	2 0		2.43
2001/2002	150	92 58	1 0		0.67
合 計	232	124 108	3 0		1.29

アマンタジンの治療投与を受けない一般外来患者由来株の1.29%に耐性株が存在することが明らかとなった。閉鎖系の老人介護施設内などでの長期にわたるアマンタジン投与後の耐性株出現と異なり、一般外来からの耐性株の出現は今後の抗ウイルス剤の使用は慎重であるべきことを示していると考えられる。我々が用いた耐性株の検出方法ではすべての耐性株を検出できず、およそ耐性株の約80%が検出可能とされている³⁾。

耐性株が感受性株と拮抗しながら、爆発的にヒトからヒトへと感染することが危惧されるが、斎藤らが述べているように耐性株の施設内流行がみられないこと³⁾から推察すると、耐性株の人から人への感染は現時点では否定的と考えられる。

今回の調査では一般外来の臨床現場から分離された耐性株の検出率1.29%という数値は、佐原ら⁴⁾が臨床現場で分離した62株（Aソ連型29株、A香港型33株）について調査した3.2%（2株）より低い検出率であった。

2001/2002年シーズンに分離されたAソ連型については塩基配列の変異が大きく、原法のPCRプライマーでは増幅できなかったため、分離株の塩基配列から新たにプライマーを設計した。Aソ連型も含め今後も新しいプライマーの設計が必要となる場合が想定される。今回の耐性株が検出された成績の一部を図1に示した。

アマンタジンは発病48時間以内での治療投与は有熱期間の有意な短縮や症状の速やかな改善が得られるとの報告もある⁵⁾ことから今後も一定の規制の範囲内で治療薬として使用され続けることが推定される。しかし、発症48時間以内の患者にアマンタジンを3日間投与した場合では耐性株の出現頻度は22.5%であったとの報告⁶⁾もあり、一般外来の臨床現場でアマンタジンを治療薬として投与する場合、耐性株が出現しないような投与方法の検討も含め、耐性株に対する監視は今後も継続していく必要があると考えられる。

IV ま と め

1. 秋田県内における2シーズンの調査結果では、一般外来の臨床現場から検出されたA型インフルエンザウイルスのアマンタジン耐性株の検出頻度は1.29%で、耐性株はいずれもA香港型であった。
2. 治療薬としてのアマンタジン投与は有効な手段として、今後も継続して行われると考えられるので、一般外来由来の分離株に対する耐性出現頻度の監視は引き続き実施していく必要があると考えられた。

文 献

- 1) 菅谷憲夫. 新型インフルエンザ対策：ワクチンと抗ウイルス剤. ウイルス, 1997; 47(1): 25-35.
- 2) 辻 克郎, 他. A型インフルエンザウイルスに対する塩酸アマンタジン使用の問題点. ウイルス, 2001; 51(2): 135-141.
- 3) 斎藤玲子, 他. 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. 感染症学雑誌, 2000; 74: 646-651.
- 4) 佐原啓二, 他. 静岡県におけるアマンタジン耐性A型インフルエンザウイルスの検出状況. 感染症学雑誌, 2001; 75(7): 576-577.
- 5) 島田堅一, 他. 小児のA型インフルエンザウイルス感染症に対する塩酸アマンタジンの治療効果について. 市立秋田総合病院誌, 1999; 9: 29-32.
- 6) 斎藤玲子, 他. 小児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、特に耐性株に注目して. 第48回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2000; 12 amC05: 109.

謝 辞

耐性株検出方法の導入に当たり御指導をいただきました新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染医学講座 公衆衛生学分野 斎藤玲子先生に深謝します。