

表2 新型インフルエンザ肺炎53例の臨床的特徴-1

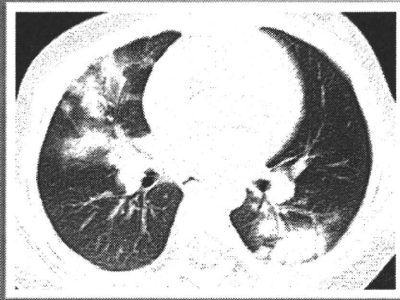
臨床的特徴	No. (%)
男児-no. (%)	34 (64%)
年齢-median-yr (range)	6 (1-16)
< 5 yr- no.(%)	13 (25%)
5-14 yr- no.(%)	38 (72%)
≥ 15 yr- no.(%)	2 (4%)
基礎疾患-no. (%)	34 (64%)
喘息(持続型, 間歇型)-no. (%)	7 (13%), 13 (25%)
アレルギー素因(喘息以外)-no. (%)	10 (19%)
症状発症から入院までの期間(d)-median (range)	1 (0-7, IQR 1-3)
入院期間(d)-median (range)	5 (3-13, IQR 5-6)
酸素飽和度(room air)(%)-median (range)	91 (85-99)
<91% - no./total no. (%)	25/52 (48%)
≥ 91% - no./total no. (%)	27/52 (52%)

Note: IQR = interquartile range.

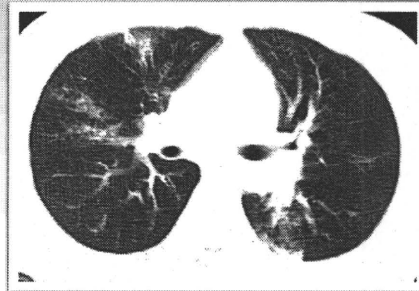
表3 新型インフルエンザ肺炎53例の臨床的特徴-2

臨床的特徴	No. (%)
治療	
抗生剤使用-no.(%)	53 (100%)
抗ウイルス剤使用-no.(%)	53 (100%)
48時間以内の抗ウイルス剤の使用-no.(%)	46 (87%)
タミフル-no.(%)	20 (38%)
リレンザ-no.(%)	32 (60%)
タミフル+リレンザ-no.(%)	1 (2%)
ステロイド剤使用-no.(%)	50 (94%)
hydrocortisone -no.(%)	2 (4%)
methylpredonisolone-no.(%)	47 (89%)
dexamethasone-no.(%)	1 (2%)
パルス療法-no.(%)	2 (4%)
酸素投与-no.(%)	33 (62%)
酸素投与期間 (d)- median (IQR)	2 (2-4)
ICU転院-no.(%)	2 (4%)
検査成績-mean±SD	
白血球数-per mm ³	9760±5223 (n = 52)
リンパ球数-per mm ³	1270±1224 (n = 52)
CRP mg/dl	3.17±2.92 (n = 52)
PCO ₂ -mmHg	37.1±5.9 (n = 22)

図1 新型インフルエンザ肺炎のCT所見
 浸潤影(consolidation) : 30/34 (88%)



4歳女児 multifocal consolidation



5歳女児 subpleural consolidation



4歳女児 multifocal consolidation



3歳男児 multifocal consolidation +GGO

図2 新型インフルエンザ肺炎のCT所見
 スリガラス影(Ground-glass opacities) : 20/34 (59%)



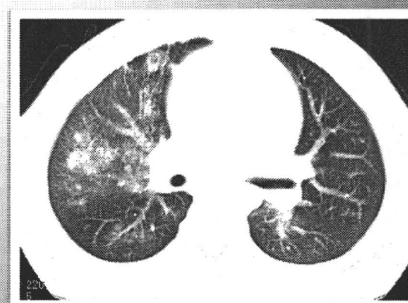
7歳男児 diffuse GGO



5歳女児 multifocal GGO

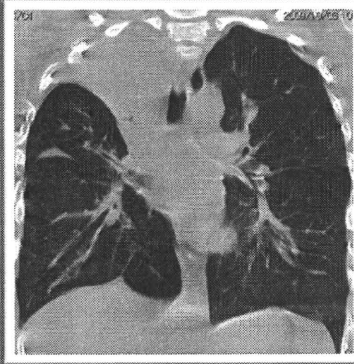


8歳男児 diffuse GGO+multifocal consolidation

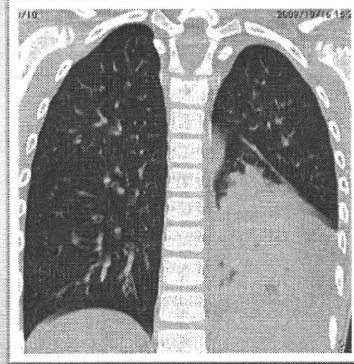


6歳女児 multifocal GGO+consolidation

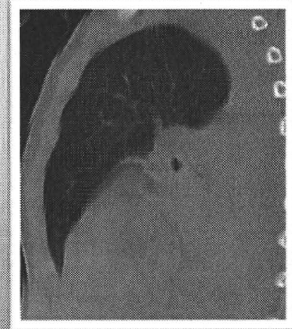
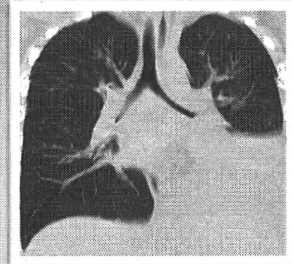
図3 新型インフルエンザ肺炎のCT所見
無気肺 (atelectasis) : 9/34 (26%)



8歳男児
GGO+atelectais of right upper
lobe and pleural effusion in
right lung

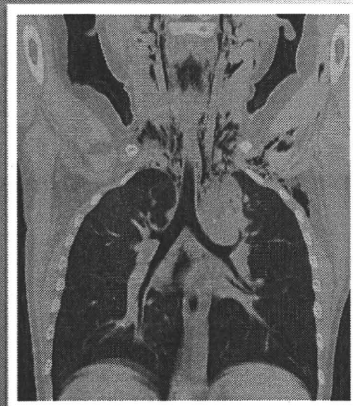


7歳男児
Atelectasis of left lower lobe

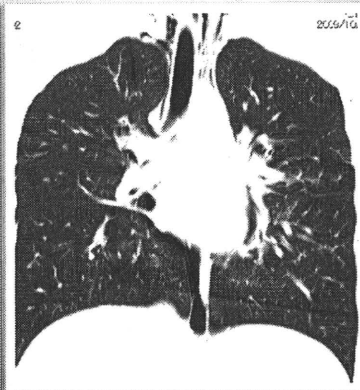


5歳男児

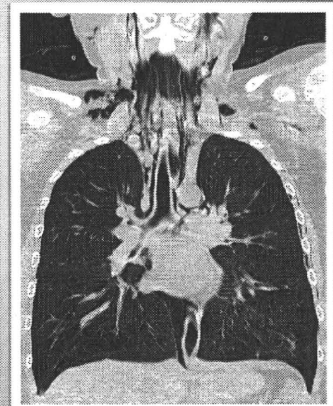
図4 新型インフルエンザ肺炎のCT画像所見
縦隔気腫 (mediastinal emphysema) : 3/34 (9%)



6歳男児



9歳女児



9歳男児

表4 新型インフルエンザ肺炎34例のCT画像所見

画像所見	No. (%)
異常所見	
浸潤影(consolidation) - no.(%)	30 (88%)
multifocal, diffuse, focal - no.(%)	15 (44%), 12 (35%), 3 (9%)
subpleural, PBV- no.(%)	6 (18%), 21 (62%)
スリガラス影 (ground-glass opacity) - no.(%)	20 (59%)
multifocal, diffuse- no.(%)	15 (44%), 5 (15%)
スリガラス影+浸潤影- no.(%)	16 (47%)
無気肺-no.(%)	9 (26%)
胸水-no.(%)	9 (26%)
縦隔気腫- no.(%)	3 (9%)
リンパ節腫脹(腋窩、肺門、縦隔)-no.(%)	12 (35%)
分布	
両側	18 (53%)
上肺野	20 (59%)
中肺野	11 (32%)
下肺野	25 (74%)
一肺野	16 (47%)
多肺野	18 (53%)

分担研究報告書

インフルエンザ A/H1N1 2009 pdm による小児肺炎症例における
血中酸化ストレスマーカー、サイトカインの検討

研究分担者：森島恒雄 (岡山大学大学院小児医科学 教授)

研究協力者：長岡義晴 (岡山大学大学院小児医科学 助教)

研究要旨

新型インフルエンザ感染により小児では肺炎患者が多数発生し、新型インフルエンザの特徴と考えられた。患者血清中のサイトカイン/ケモカイン、酸化ストレスマーカーを経時的に測定し、その病態について検討した。新型インフルエンザ肺炎の初期には IL-6、sTNF-R1 などの炎症性サイトカイン産生が亢進していた。また、回復期の NOx 上昇が肺炎群の特徴であった。肺局所で起きた炎症反応により、ROS (活性酸素) が産生され、続いて NOx 産生が誘導されたと推測された。肺における過剰な炎症反応を抑制し、酸化ストレスを軽減することは、重症肺炎の治療上、重要な戦略と考えられた。

A. 研究目的

2009年5月から日本全国でインフルエンザ A/H1N1 2009 pdm (以下、新型インフルエンザ) の流行が起こった。新型インフルエンザ感染により小児では肺炎 (図 1) 肺炎の最重症例として呼吸窮迫症候群 [ARDS] (図 2)、無気肺 (図 3)、鑄型気管支炎などが多発した。喘息発作や RS ウイルス細気管支炎様の喘鳴・低酸素血症を呈した症例も見られた。それらの多くは、発熱後 0~2 日以内に発症し、急速に症状が進行した。季節性インフルエンザにおいては、このような重篤な下気道症状の発生は少なく、新型インフルエンザの特徴と考えられた。また、新型インフルエンザ肺炎患児では、基礎疾患に気管支喘息等、アレルギー性素因を有する者が多かった。これら小児の新型インフルエンザ肺炎の特徴を踏まえその病

態を解明するために、患者血清中のサイトカイン/ケモカイン、NOx、酸化ストレスマーカーについて検討した。

B. 研究対象と方法

(1) 肺炎群

2009年10月~2010年2月に新型インフルエンザ肺炎で入院加療した 37 症例。年齢の中央値は 7 歳 (3-12 歳)、男:女=27:10。入院時 (急性期) と退院時 (回復期) に採血を行い、血清を採取した。

(2) 非肺炎群

新型インフルエンザに罹患したが下気道症状はなかった 18 症例。初診時 (急性期) とその 1 週間後 (回復期) に採血を行い、血清を採取した。(そのうち急性期と回復期にペアで採血できたものは 5 症例)

(3) 測定項目

非特異的 IgE は回復期のみ測定した。急性期・回復期の血清を用いてサンドイッチ型 ELISA 法により、IL-6、IL-8、IL-17、sTNF-R1、RANTES、Eotaxin、チオレドキシン (TRX) を測定した。また Nitrate/Nitrite Assay Kit により NOx を測定した。総合的な酸化ストレスマーカーである d-ROM を装置 FRAS4 により測定した。

C. 研究結果

(1) 非特異的 IgE (図 4)

回復期の血清 IgE は、肺炎群において非肺炎群よりも有意に高値であった (1310 ± 254 IU/ml、 363 ± 73 IU/ml、 $p=0.001$ 、t 検定)。

(2) IL-6 および sTNF-R1 (図 5)

肺炎群の急性期 IL-6 は、同群の回復期 IL-6 よりも有意に高値であった (11 ± 2 pg/ml、 3 ± 1 pg/ml、 $p<0.0001$)。また、肺炎群の急性期 IL-6 は非肺炎群の急性期 IL-6 よりも有意に高値であった (11 ± 2 pg/ml、 7 ± 5 pg/ml、 $p=0.002$)。

肺炎群の急性期 sTNF-R1 は、同群の回復期 sTNF-R1 よりも有意に高値であった (1454 ± 89 pg/ml、 996 ± 63 pg/ml、 $p<0.0001$)。

(3) RANTES および Eotaxin (図 6)

肺炎群の急性期 Eotaxin は同群の回復期に Eotaxin よりも有意に低値であった (74 ± 15 pg/ml、 78 ± 10 pg/ml、 $p=0.05$)。また、肺炎群の急性期 Eotaxin は非肺炎群の急性期 Eotaxin よりも有意に低値であった (74 ± 15 pg/ml、 81 ± 9 pg/ml、 $p=0.02$)。

有意差はなかったが、RANTES でも同様の

傾向が見られた。

(4) IL-8 (図 7)

肺炎群の急性期 IL-8 は、非肺炎群の急性期 IL-8 よりも有意に低値であった (64 ± 38 ng/ml、 111 ± 59 ng/ml、 $p=0.0009$)。肺炎群の IL-8 は急性期<回復期であったのに対し、非肺炎群の IL-8 は急性期>回復期であり、両群で IL-8 の経時的変化が異なる傾向が見られた。

(5) IL-17

肺炎群のうち 3 例でのみ上昇が見られたが CRP など他の炎症マーカーとの相関はなかった。非肺炎群では IL-17 は全例、検出感度以下であった。

(6) NOx (図 8)

肺炎群では急性期に比べ回復期に NOx が有意に上昇していた (15 ± 3 μ M、 40 ± 4 μ M、 $p<0.0001$)。また肺炎群の回復期 NOx は、非肺炎群の回復期 NOx よりも有意に高値であった (40 ± 4 μ M、 22 ± 2 μ M、 $p=0.03$)。

(7) d-ROM (図 9)

肺炎の有無にかかわらず新型インフルエンザに感染した児は、健常小児よりも d-ROM 値が高い傾向にあった。肺炎群の急性期 d-ROM は同群の回復期 d-ROM よりも有意に高値であった (341 ± 14 U.CARR、 313 ± 15 U.CARR、 $p=0.05$)。

(8) TRX

肺炎群、非肺炎群ともに有意な上昇は見られなかったが、ARDS に進展し体外式膜型人工肺 (ECMO) で救命した 1 例では一過

性に高値を示した (153ng/ml)。

※(2)～(8)は Wilcoxon 順位検定で有意差を検討した。

D. 考察

一般にアレルギー素因を有する児では血清中 IgE が高値を示すことが多い。肺炎群の回復期 IgE は非肺炎群のそれよりも高値であったことから、アレルギー素因が新型インフルエンザ肺炎の悪化に関与していたことが推測された。また、新型インフルエンザウイルス肺炎を契機に下気道で IgE 産生が促進された可能性も考えられた。

IL-6、sTNF-R1 は代表的な炎症性サイトカインであるが、肺炎群の急性期でこれらは高値を示し肺局所での炎症を反映しているものと考えられた。しかし著しい高値(いわゆるサイトカインストームの状態)を示した症例は見られなかった。

RANTES、Eotaxin、IL-8 はそれぞれ単球/好酸球、好酸球、好中球に対するケモカインであるが、これらは肺炎群の急性期にむしろ抑制されていた。新型インフルエンザ感染初期における炎症細胞の遊走抑制が肺炎の増悪につながった可能性がある。

酸化ストレスマーカーに関しては、d-ROM が急性期に上昇し回復期に低下する一方で、NOx は急性期よりも回復期に上昇していた。新型インフルエンザ感染初期には下気道においてウイルスの増殖と炎症性サイトカインの産生亢進が起こり、活性酸素(ROS)が産生される。急性期の d-ROM 上昇はその ROS 増大を反映していると推測された。続いて下気道では好酸球や好中球の遊走・浸潤が起こり、ROS や炎症性サ

イトカインの刺激によって気道上皮やこれらの炎症細胞で NO 合成酵素が誘導される。その結果、回復期に NOx が上昇すると考えられた。

NOx は喘息等の呼吸器疾患で気道炎症のマーカーとしても注目されている。回復期に NOx が上昇した状態であることは、臨床的にあるいは X 線画像的に肺炎が回復した時期においても微小な気道炎症や組織障害は遷延していること意味すると推測された。(図 10)

TRX は抗酸化作用・抗好中球炎症作用を有するタンパクで、成人の ARDS では治療薬として治験が進行中である。本研究報告でも 1 例のみではあるが新型インフルエンザによる ARDS 症例で高値を示しており、さらに症例を集積して検討を進めたい。

このようにサイトカインや酸化ストレスが関与しあって形成される肺炎以外に、無気肺を主体とする症例も存在する。新型インフルエンザ肺炎による死亡例の剖検で II 型肺胞上皮へのインフルエンザウイルス感染が認められた報告があり、II 型肺胞上皮の障害からサーファクタントの産生が低下し、急速に無気肺を形成する病態も考えられる。

E. 結論

新型インフルエンザ肺炎にはアレルギー素因の関与が示唆された。新型インフルエンザ肺炎の初期には炎症性サイトカイン産生が亢進する一方、ケモカイン産生は抑制される傾向があり、肺炎の増悪との関連が考えられた。新型インフルエンザ感染時には、肺炎の有無にかかわらず、酸化ストレスが増大していたが、回復期の NOx 上昇が

肺炎群の特徴であった。肺局所で起きた炎症反応により、ROS が産生され、続いて NOx 産生が誘導されたと推測された。

肺における過剰な炎症反応を抑制し、酸化ストレスを軽減することは、重症肺炎の治療上、重要な戦略と考えられた。

F. 研究発表

・ Nagaoka Y. Morishima T. et.al: 2009
 Pandemic Influenza A (H1N1) Associated Encephalopathy Among Japanese Children. Option for the Control of Influenza VII. Sep.2010/Hong Kong

・ 長岡義晴、森島恒雄ら：新型インフルエンザ肺炎症例における血中酸化ストレスマーカーおよびサイトカインの検討. 第42回日本小児感染症学会. 2010年11月/仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 2

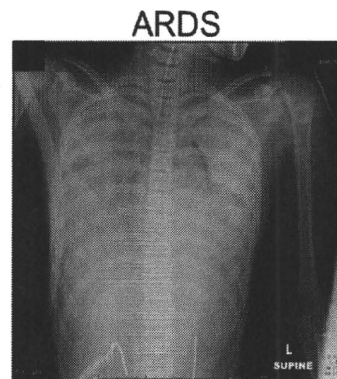


図 3

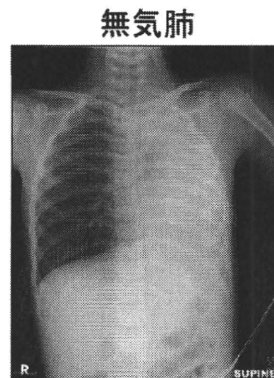


図 1

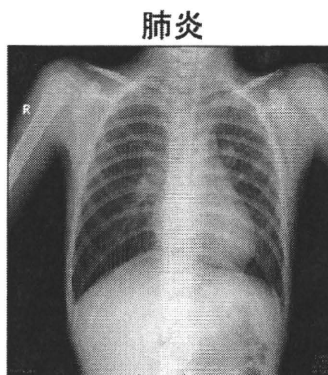


図 4

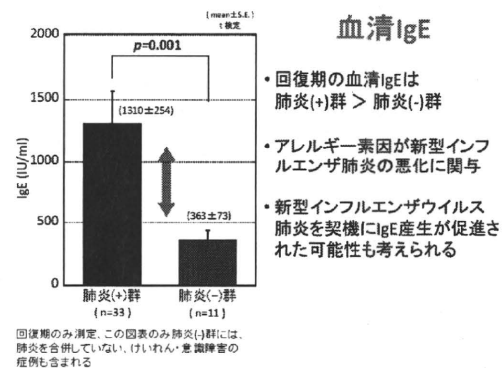


図 5

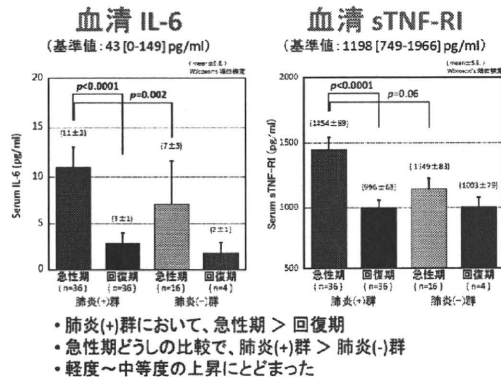


図 8

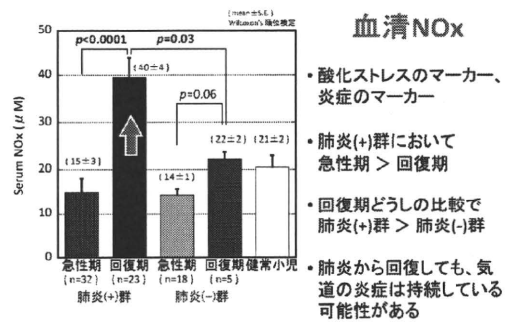


図 6

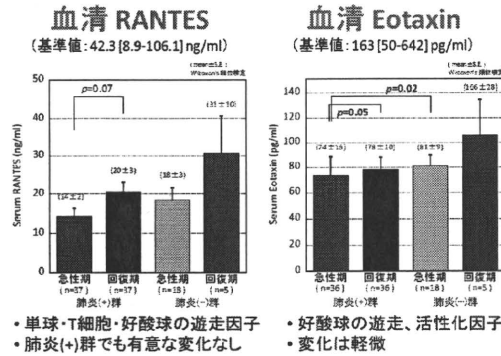


図 9

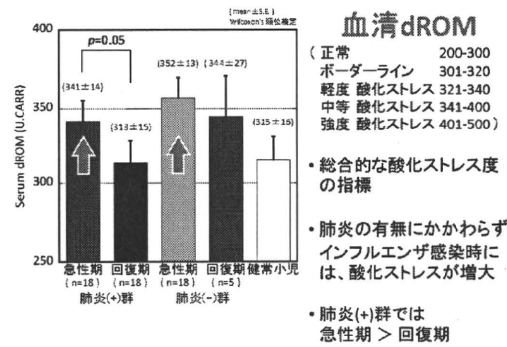


図 7

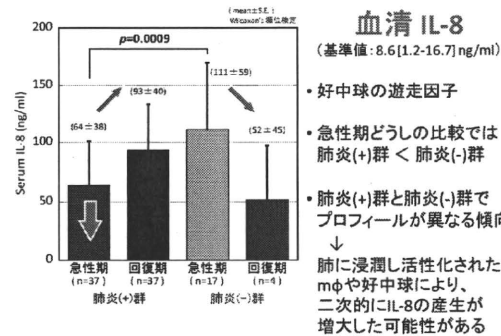
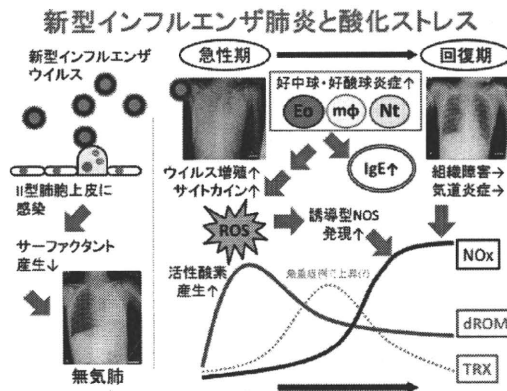


図 10



「海外（ミャンマー、レバノン）におけるインフルエンザと、日本のRSウイルス疫学」

分担研究者 齋藤玲子

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分野

分担研究者 鈴木 宏

新潟青陵大学看護福祉心理学部看護学科

共同研究者： クライド・ダパット、鈴木康司、イゾルデ・ダパット、内藤眞（新潟大学）、ヤデナ・チョウ（サンピュア病院・ヤンゴン）、イーイーミン（DMR、ネピドー）、佐野康子（佐野医院）、ハサン・ザラケット（セントジュード・メディカルセンター）

研究要旨

我々は、情報のほとんどない、ミャンマー国内にて2007-2009年に4000件近くの臨床検体を採取し、インフルエンザウイルスを約1000件分離・培養した。インフルエンザは雨期の5-11月に流行することが判明した。新型インフルエンザは2009年には散発のみで本格的な地域流行には至らなかったものの、すべてClade 2に属するウイルスであった。インフルエンザA/H3N2はミャンマーで採取された株は常に日本より半年から1年半先んずる傾向があり、ワクチン株の選択に重要な情報をもたらすと考えられた。

ミャンマーにおける薬剤耐性インフルエンザについてもモニターを行い、世界的な傾向と同様に近年アマンタジン耐性やオセルタミビル耐性インフルエンザが流行の主流をしめたことが判明した。世界的に初となる二重耐性A/H3N2が2007年と2008年に2株見つかった。オセルタミビルとアマンタジンの二重耐性A/H1N1も見つかった。ミャンマーのインフルエンザをモニターすることで世界的なインフルエンザ伝播経路の解析に大きく貢献すると思われる。

補足研究：

2009-2010年にレバノンにおいてもインフルエンザ疫学調査を行い、1年間で200件近くのインフルエンザ様疾患患者から検体を採取し、30件が新型インフルエンザ陽性と確認された。

2010年に新潟市内でRSウイルスの疫学調査を行い、97件の鼻汁吸引液を採取した。39件がA型RSVであり、B型が2件RSVであった。

A. 研究目的

温帯地域では、インフルエンザは寒い冬に流行する急性ウイルス性疾患であるが、

熱帯・亜熱帯ではそれとは異なり、インフルエンザは雨期に流行する。ミャンマーは、東南アジアに位置し、ほぼ鎖国状態であり

インフルエンザについての情報は皆無である。我々は、2005年からミャンマー国で、旧首都のヤンゴン市を中心に、迅速診断キットを使ったインフルエンザ・サーベイランスを開始した。今回の報告は2007-2009年の3年間にミャンマー国ヤンゴン市とネピドー市で行われたサーベイランスの結果を、ウイルス型別、遺伝子近縁性、薬剤感受性について報告する。

B. 研究方法

2007-2009年の年間を通じて、ミャンマー国ヤンゴン市、およびネピドー市（ネピドーは2008年から）の二都市の診療所を訪れた、急性上気道炎患者を対象に、インフルエンザ迅速診断キット（デンカ生研社）を用いてスクリーニングを行った。主にキット陽性の検体を中心として、ウイルス輸送培地に咽頭ぬぐい液を採取した。採取した検体は、-80°Cで保存した。

新潟大学に凍結した検体を輸送後、MDCK細胞を用いてウイルス分離、培養を行った。CPEが確認された検体については、二代継代後、赤血球凝集素阻止反応（HA1）と、PCRを併用してインフルエンザウイルスの型別（A/H1N1pdm, A/H1N1 seasonal, A/H3N2, B）を行った。

培養検体から、亜型やシーズン採取地ごとに選択して、HA遺伝子シーケンスを行い、我々が日本で採取したインフルエンザウイルスや、遺伝子バンク上に登録された株とあわせて遺伝子相同性を樹形図解析で解析した（Neighbor-joining法）。

薬剤耐性検査については、M2阻害剤（アマンタジン）とNA阻害剤（オセルタミビル、ザナミビル）に対して行った。アマンタジン耐性に対しては、TCID50による感受性検査と、サイクリングプローブ法によるM2遺伝子Ser31Asn変異を検出した。NA阻害剤耐性に関しては、オセルタミビルとザナミ

ビルに対してそれぞれ蛍光法によるIC50法による感受性検査と、H1N1に関してはオセルタミビル耐性のマーカーであるHis275Tyr (His274Tyr)をサイクリングプローブ法にて検出した。IC50法による耐性の判定は同一薬剤の感受性株の平均値から3SDを上回った場合とし、外れ値を呈した株はNA遺伝子のシーケンスにてアミノ酸変異部位を確認した。

（倫理面への配慮）

本調査においては、検体採取と患者情報聴取に当たって、患者及に十分な説明を各医療機関で行い、ミャンマー国第一医科大学の倫理委員会で承認を得ている。

C. 研究結果

2007-2009年の3年間に合計3924件の急性上気道炎患者の咽頭ぬぐい液を迅速キットで検査した（表1）。A型インフルエンザ陽性は1105件、B型陽性は293件であった。ウイルス培養により、3年間でA/H1N1（季節性）187件、A/H3N2は547件、B型214件A/H1N1pdm 16件を検出した（表2）。

疫学曲線では、2つの都市ともインフルエンザは、5-11月の雨期に一致して患者がみられた（図1）。

流行したインフルエンザの型・亜型は、2007年は、B型が主流のA/H3N2との混合流行で、2008年はA/H3N2が最初の2ヶ月間流行し、その後、B型と季節性A/H1N1の流行となった。2009年は、A/H3N2と季節性A/H1N1の混合流行であった。ヤンゴン市では8月に、ネピドー市では9月にA/H1N1pdmが検出されたが、大きな地域流行には至らず、散発のみでその年のインフルエンザシーズンが終了した。

A/H3N2の樹形図解析では、2007年にミャンマーで採取されたA/H3N2は日本の

2008-09 年 ワ ク チ ン 株 の A/Uruguay/716/2007 類似の株であった。2008 年にミャンマーで流行した H3N2 は、その半年後の 2008-09 年シーズンに日本で流行した株と類似していた。また、ミャンマーで 2009 年に流行した H3N2 は、Victoria/208/2009 類似の株であった。なお、2010-2011 年シーズンの日本のワクチン株は A/Victoria/210/2009 であり (A/Perth/16/2009 類似)、A/Victoria/208/2009 とは樹形図上別のクレードに属するが、抗原性のうえでは違いはないと言われる。日本では、2010 年に A/Victoria/210/2009 類似の株も A/Victoria/210/2009 類似の株もどちらも採取されている (図 2)。

A/H1N1pdm は 2009 年に採取された株は 16 件と少数であったが、全て Glade 2 に属し、日本で 8 月以降に地域流行を起こした H1N1pdm と同じのニューヨーク系のウイルスであった (図 3)。

薬剤耐性インフルエンザに関しては、2008 年には A/H1N1 の全体 66 件中の 62 件 (96.7%) が M2 遺伝子 S31N 変異のみをもつアマンタジン耐性株であり、1 件 (1.5%) が NA 遺伝子 H275Y 変異を持つオセルタミビル耐性株であった (図 4. A)。また、3 件は、M2 遺伝子 S31N 変異と NA 遺伝子 H275Y 変異を持つアマンタジンとオセルタミビルの二重耐性株であった。この 4 株 (単独耐性と二重耐性) のオセルタミビルに対する IC50 は、平均 850nM と上昇しておりオセルタミビル耐性であった。HA 遺伝子と NA 遺伝子の樹形図解析では、Glade 2C に属し、アマンタジン耐性に、NA 遺伝子の変異が加わった状態と考えられた。翌年の 2009 年の 121 株の H1N1 は全て NA 遺伝子 H275Y 変異のオセルタミビル耐性株であった。

A/H3N2 に関しては、2007-2009 年に採取された株は全て M2 遺伝子 S31N 変異をもつ

アマンタジン耐性株であった (図 4. B)。特記すべきは、2007 年と 2008 年に 1 株ずつ M2 遺伝子 S31N 変異と NA 遺伝子 Glu136Lys 変異をもつ、アマンタジンとザナミビルの二重耐性株が見つかったことである。この株はザナミビルに対する IC50 が、それぞれ、60nM, 33nM と上昇していたが、オセルタミビルに対しては、0.13nM, 0.16nM と感受性であった (表 3)。患者同士は面識無く、抗インフルエンザ剤も投与されていない。HA 遺伝子、NA 遺伝子シーケンス上は、2 つの株はそれぞれその年の流行株と同じグループに属していた。

D. 考察 ミャンマーは、中国、インド、タイなど、人口が多く人獣が近接して生活し、新しいインフルエンザが生まれる可能性が高い地域に位置する。しかし、政治的には半鎖国状態であるため感染症の情報はほとんど外部に報告されていなかった。我々は、2005 年からヤンゴン市の診療所で迅速診断キットを使ったインフルエンザのスクリーニングを開始し、インフルエンザは肌寒くなる雨期の 5-11 月に流行することが判明した。その後も、検体を継続的に採取し、新潟大学にてウイルス培養を行い、インフルエンザウイルスの同定を行った。2008 年からは、首都ネピドーで検体の採取を開始し、2007-2009 年の 3 年間に 2 つの都市をあわせて 4000 件あまりの検体を採取し、1000 株近くのインフルエンザウイルスを分離した。結果として、二都市ともほぼ同じ時期にインフルエンザが流行することが判明した。ミャンマーでは新型インフルエンザの侵入は遅れ、2009 年には散発例のみで本格的な地域流行にいたらなかった。

薬剤耐性インフルエンザ株の流行は世界的なトレンドにほぼ同調しているか、やや遅れていた。季節性 A/H1N1 では 2008 年

にアマンタジン耐性株が流行したが、2009年にはオセルタミビル耐性株に完全に置き換わった。オセルタミビル耐性 A/H1N1 の流行は日本より半年遅れていた。A/H3N2 については 2005 年よりアマンタジン耐性株が検出されており、他の国々と同様に 100%アマンタジン耐性の状態が続いている。同国では抗インフルエンザ剤は用いられておらず、薬剤耐性株の国際伝播によると考えられる。特記すべきこととしては、ザナミビルとアマンタジン、オセルタミビルとアマンタジンなどの二重耐性株が見つかったことである。これら二重耐性株は日本での報告はない。特にザナミビルとアマンタジン耐性 A/H3N2 は、世界初の報告となった。しかし、ザナミビルに対する IC50 の上昇は、30-60nM と軽度であり、臨床的に影響は少ないと考えられる。現在「耐性」の判定は実験室的に外れ値を規定することでなされており、必ずしも臨床的に効果が減弱することを意味していない。今後、症例の経過との重ね合わせにより「臨床的な耐性」の規定がなされるべきである。

ザナミビル耐性株は NA 蛋白 136 位の変異に起因する。同じ変異による耐性株はオーストラリアや米国 CDC のグループから A/H1N1 で報告されている。しかし、オーストラリアの H1N1 変異株は、咽頭ぬぐい液から遺伝子シーケンスを行った検体からは見つかっておらず、MDCK 培養株のみで見つかっている。現在の方法では培養でウイルス量を増やさなければ IC50 による NA 活性の測定ができないため、ウイルス培養は必須であるが、培養により耐性株が多数選択されてしまい誤った耐性の判断が下されてしまうことも問題である。我々の見いだした H3N2 の耐性株はオリジナル検体にも 136 位変異が認められているため、齟齬はなかったが、今後耐性の判定をする場合にはオリジナル検体のシーケンスも必要になって

くと思われる。

ミャンマー株をモニターすることは、日本にとってはワクチン株を選定する上で、非常に大きなメリットがあると考えられる。今回の調査で判明した大きな特徴としては、A/H3N2 に関してはミャンマーでは、日本の流行株より半年～1 年半早く新しい抗原性の株が流行することである。ミャンマーでは 2009 年に採取された株が (Victoria/208/2009-like)、日本では半年～1 年ほど遅れて 2010 年春～夏期に採取された。しかしながら、これまでの我々の検討では A/H1N1 や B 型では、ミャンマー株の時間的優位性は見られないが多かった。おそらく、ミャンマーではアジア起源のインフルエンザの伝播ははやく、欧米で新しい株が起こった場合（オセルタミビル耐性 H1N1 や H1N1pdm など）には、流行が半年～一年遅れる傾向にあると考えられる。

E. 結論

ミャンマーでインフルエンザのサーベイランスを行うことで、新しい抗原性の株や、薬剤二重耐性株などを見いだすことができた。今後も、アジアの重要なセンチネル・サーベイランスポイントとしてミャンマーの調査を継続すべきである。

補足研究

1. レバノンのインフルエンザ疫学

2009 年 5 月-2010 年 1 月にインフルエンザ様疾患患者から咽頭・鼻腔ぬぐい液を 197 件採取した。うち 50 件が迅速キットで A 型陽性であり、30 件について新潟大学にて詳細な解析を行った。検体はウイルス分離培養の結果から全て新型インフルエンザと判明した。10 月に新型による地域流行があり、全て M2 遺伝子 31 位変化 (ser→asn) をもつアマンタジン耐性であり、1 件は内服歴がないにも関わらず、NA 遺伝子 275 位 (hys→

tyr)がみられ、オセルタミビル耐性であった。ヨーロッパとアジアの中間に属するレバノンはインフルエンザの世界的伝播経路を考える上で重要であり、2010-2011年シーズンと合わせ今後詳細に検討する予定である。

なし

3. その他

特記すべきこと無し

2. 新潟市内のRSウイルス疫学解析

2010-2011年に新潟市内の小児科にてRSウイルスの疫学調査を行った。発熱や鼻汁、下気道症状を呈した小児97件の鼻汁吸引液を採取し、39件がRT-PCRでA型RSV陽性、B型が2件であった。G蛋白遺伝子型の調査では、A型は全てNA1型に属し、B型はBA9型が多かった。

RSウイルスの疫学は報告も少なく、今後も調査を継続の予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Dapat, C, Suzuki, Y, Saito, R, Kyaw, Y, Myint, YY, Lin, N, Oo, HN, Oo, KY, Win, N, Naito, M, Hasegawa, G, Dapat, IC, Zaraket, H, Baranovich, T, Nishikawa, M, Saito, T, Suzuki, H. Rare Influenza A (H3N2) Variants with Reduced Sensitivity to Antiviral Drugs. Emerg Infect Dis. 16 (3):493-496, 2010.

2. 学会発表

1. Reiko Saito, Overview of Myanmar influenza project. The 3rd Myanmar-Japan Biomedical Workshop — Influenza and other infectious diseases in Myanmar—, Yangon, Myanmar, 2nd Feb, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

表 1. 2007-2009 年のミャンマーにおけるインフルエンザ検体数、迅速キット陽性、培養陽性数

		2007 年	2008 年	2009 年	合計
検体数 (件)		1250	2079	595	3924
迅速診断 キット	A 陽性	124	394	587	1105
	B 陽性	160	133	0	293
ウイルス 培養	A/H1N1 (季節性)	0	66	121	187
	A/H3N2	64	134	349	547
	B	112	102	0	214
	新型 A/H1N1			16	16

表 2. ザナミビル+アマンタジン二重耐性 H3N2 (Q136K) の NA 阻害剤感受性試験 (IC50)

Strains	Passage history	NA mutation	IC50s of NA Inhibitors (nM)				Amantadine sensitivity (M2 mutation)
			Zanamivir	Fold change	Oseltamivir	Fold change	
All NAI-sensitive H3N2 viruses	MDCK2	None	1.12 ± 0.40	1	0.86 ± 0.44	1	Resistant (S31N)
A/Myanmar/M187/2007	MDCK2	Q136K	59.72 ± 3.83	53.3	0.13 ± 0.05	0.2	Resistant (S31N)
A/Myanmar/M114/2008	MDCK2	Q136K	33.37 ± 7.02	29.8	0.16 ± 0.03	0.2	Resistant (S31N)
A/Texas/131/2002†		None	1.43 ± 0.09	1.3	0.99 ± 0.09	1.2	Sensitive
A/Texas/131/2002_E119V†		E119V	5.43 ± 0.68	4.8	94.33 ± 2.06	109.7	Sensitive

図1. ヤンゴン市及びネピドー市のインフルエンザ型別推移

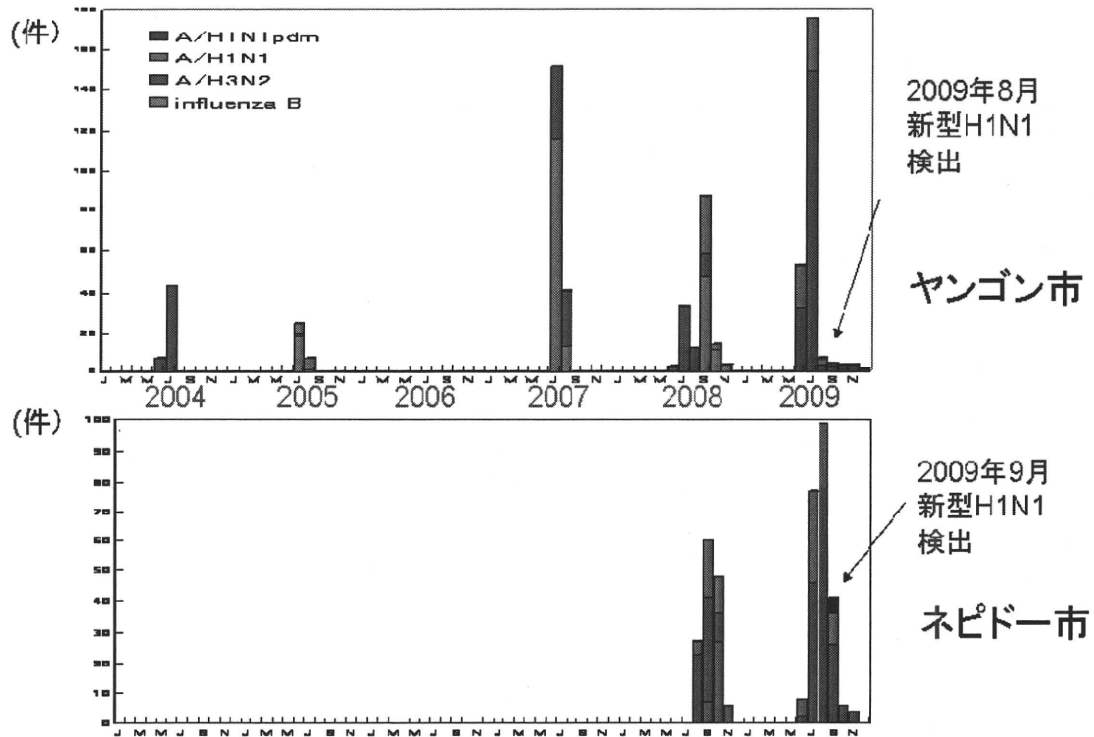


図2. A/H3N2の HA遺伝子解析

Subunit1 793塩基
Neighbor-joining法

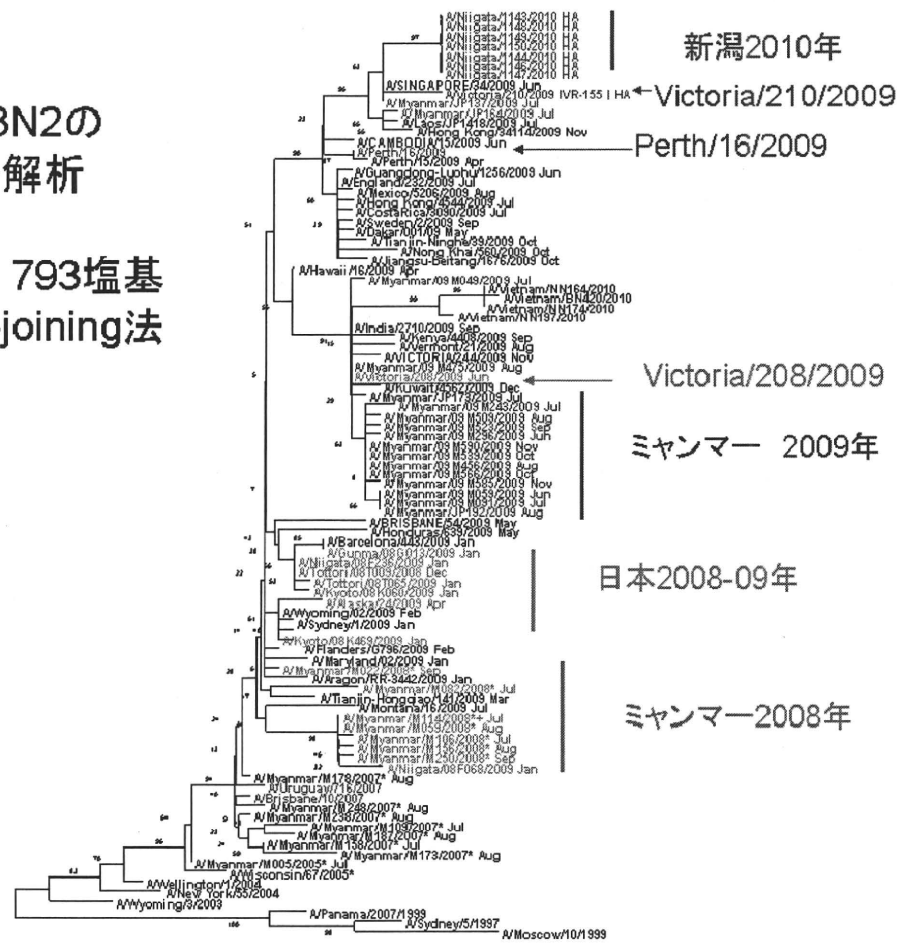


図3. 新型A/H1N1pdmインフルエンザウイルスのHA遺伝子解析

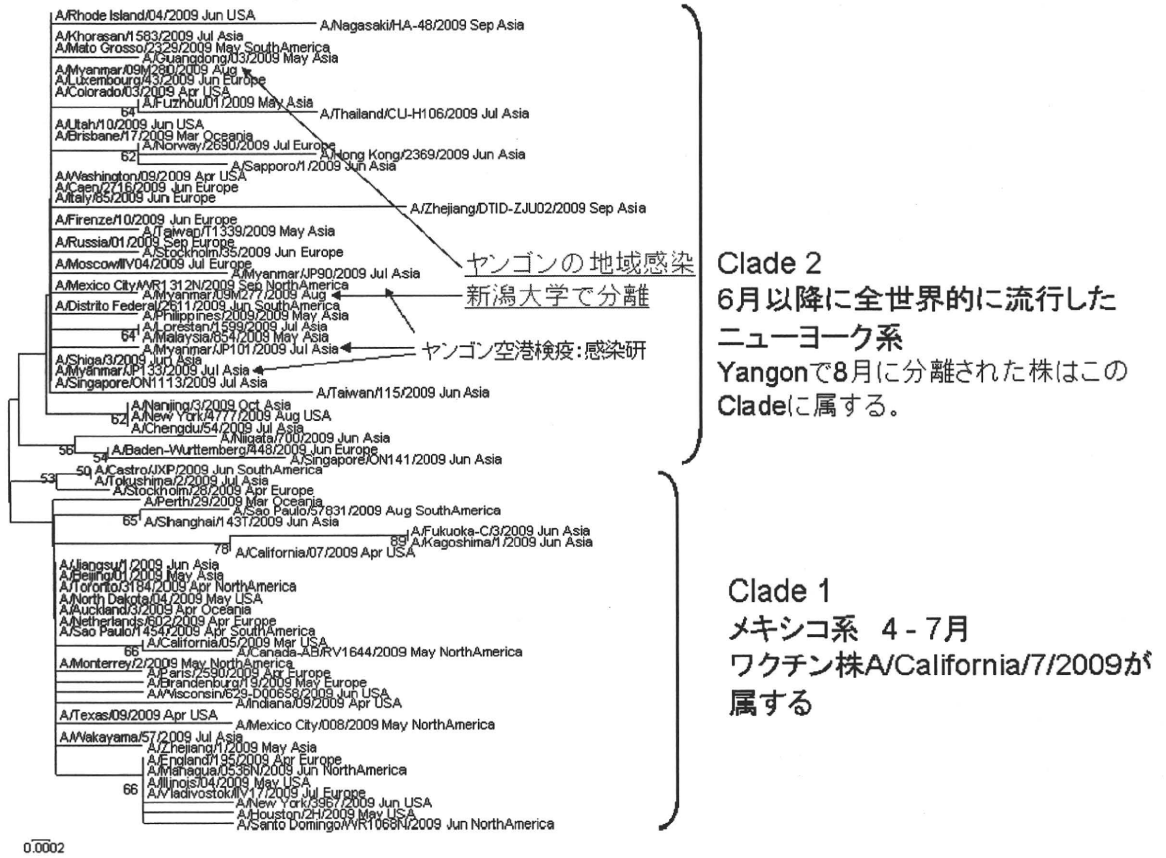
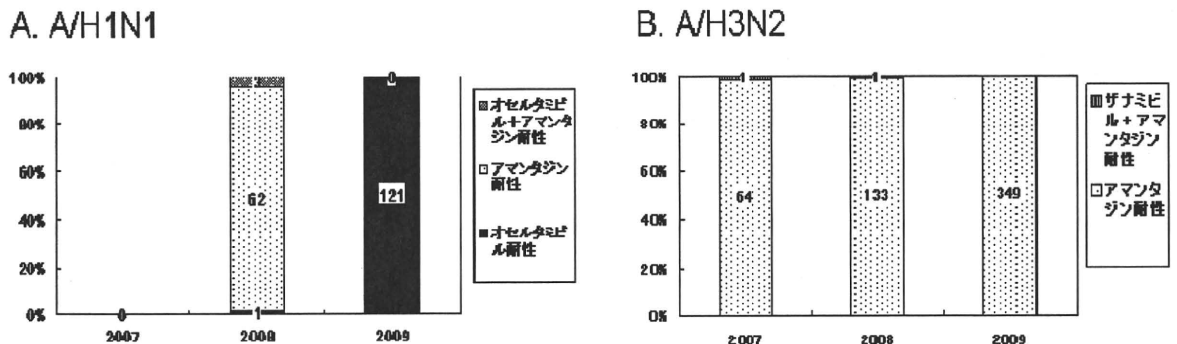


図4. ミャンマーにおけるA/H1N1とA/H3N2の薬剤耐性頻度



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

研究分担者 田代真人 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 センター長

研究要旨 2009年にメキシコ、北米で発生した新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）はその後、日本を含む世界各国に広がった。A/H1N1pdm株は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では新型インフルエンザの治療薬としてNA蛋白を標的とするオセルタミビルおよびザナミビルを推奨している。世界各国で分離されているA/H1N1pdm株のほとんどは両薬剤に対して感受性であるが、散発的に、NAに特徴的なアミノ酸置換（H275Y）をもつオセルタミビル耐性株が検出されている。日本は世界最大のオセルタミビル使用国であることから、オセルタミビル耐性株が流行の主流になれば、医療機関における治療方針の見直しが必要となる。したがって、国内における薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握し、自治体および医療機関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ともに、国際的にも大きな影響を与える。そこで、全国の地方衛生研究所（地研）との共同研究により、A/H1N1pdmについて抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランスを実施した。その結果、予想通り、すべてのH1N1pdmウイルスはアマンタジンに耐性であった。オセルタミビル耐性ウイルスは1.2%以下の低頻度で検出されたが、これらの多くはオセルタミビル使用例であり、ペラミビルに対しても交叉耐性を示したが、いずれも伝播拡大伝播傾向は認められなかった。一方、ザナミビル耐性ウイルスは検出されなかった。

A. 研究目的

2009年にメキシコ、北米で発生した新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）はその後、日本を含む世界各国に広がった。A/H1N1pdm株は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では新型インフルエンザの治療薬としてNA蛋白を標的とするオセルタミビルおよびザナミビルを推奨している。世界各国で分離されているA/H1N1pdm株のほとんどは両薬剤に対して感受性であるが、散発的に、NAに特徴的なアミノ酸置換（H275Y）をもつオセルタミビル耐性株が検出されている。

日本は世界最大のオセルタミビル使用国であることから、オセルタミビル耐性株が流行の主流になれば、医療機関における治療方針の見直しが必要となる。したがって、国内における薬剤耐性

株の発生状況を迅速に把握し、自治体および医療機関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ともに、国際的にも大きな影響を与える。

そこで、全国の地方衛生研究所（地研）との共同研究により、A/H1N1pdmについて抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランスを実施した。

なお、本研究は、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第一室、全国地方衛生研究所、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源情報部門の協力により行われた。

B. 研究方法

2009/10シーズンのA/H1N1pdm分離株について、

全国 80 カ所の各地研において毎週概ね 5 株を目
標値として NA 遺伝子の部分塩基配列を決定し、
H275Y オセルタミビル耐性マーカーの有無を検索
した。H275Y 耐性マーカーをもつ分離株について
は、引き続き感染研インフルエンザウイルス研究
センターにおいてオセルタミビルおよびザナミ
ビルに対する薬剤感受性試験、赤血球凝集抑制
(HI) 試験による抗原性解析、ならびに NA 遺伝
子系統樹解析を行った。また各地衛研から感染症
サーベイランスシステム (NESID) に登録された
インフルエンザウイルス分離株の 5% を無作為に
抽出し、随時分与を依頼し性状解析を行った。こ
れらの分与依頼株すべてについてもオセルタミ
ビルおよびザナミビルに対する薬剤感受性試験
を行った。

(倫理面への配慮)

患者検体は、受診医療機関からインフォームド・
コンセントのもとに国のサーベイランス事業に
対して提供されたものであり、各地衛研でウイル
スの分離がなされたものである。検体提供者につ
いては、都道府県名または指定都市名以外には、
個人名、住所地域等は特定されないよう配慮した。

C. 研究結果

1. 国内の耐性株検出状況

地研別のオセルタミビル耐性 A/H1N1pdm 株検出状
況を調べた。各地研における NA 遺伝子部分塩基
配列の決定および感染研における薬剤感受性試
験を合わせて、A/H1N1pdm 分離株 6,089 株につ
いて解析を行った。

その結果、69 株のオセルタミビル耐性株が検出
され、出現頻度は 1.13% であった。2009 年 12 月
の第 1 報で報告された出現頻度は 1.6% であり (2)、
これらは 2008 年以前の季節性 H1N1 インフルエン
ザにおけるバックグラウンド値と同様であった。
現時点ではオセルタミビル耐性株の出現の増加
はみられていない。

各地研において解析された A/H1N1pdm 分離株は、
無作為に抽出されたものが大半であった。しかし、
一部には、インフルエンザ入院サーベイランス

(重症化、死亡例) からの検体や薬剤治療が奏功
していない事例を優先的に調べた成績も含まれ
ていることを考慮する必要がある。

また、検出された 69 株のオセルタミビル耐性
株のうち 7 株はオセルタミビル耐性株と感受性株
の混合配列 (H275H/Y) をもっていた。

都道府県別オセルタミビル耐性 A/H1N1pdm 株検
出状況からは、国内で検出されたオセルタミビル
耐性株はほとんどが散发例であり、ヒトからヒト
への感染伝播は、限局した事例を除いて確認され
ていない。また、耐性株の大半はオセルタミビル
の治療投与または予防投与中に検出されている。

2009/2010 シーズンに感染研において行われた
海外分離株を含む薬剤感受性試験の実施状況を
季節性 H1N1、H3N2 および B 型株と合わせて解析
した。国内で分離された A/H3N2 分離株 5 株およ
び B 型分離株 15 株について薬剤感受性試験を行
った結果、いずれもオセルタミビルおよびザナミ
ビルの両薬剤に対して感受性であり、耐性株は検
出されなかった。

2. 薬剤感受性試験

H275Y オセルタミビル耐性マーカーをもつ
A/H1N1pdm 分離株について NA-Star 基質を用いた
化学発光法により、オセルタミビルおよびザナミ
ビルに対する薬剤感受性試験を行った。その結果、
H275H/Y の混合配列株を除くすべての耐性株は、
感受性株に比べて平均で約 350 倍高い IC50 値を
示し、オセルタミビルに対する感受性が著しく低
下しており、薬剤感受性試験においてもオセルタ
ミビル耐性株であることが確認された。H275H/Y
の混合配列株では、耐性株と感受性株の中間の
IC50 値を示した。また、すべてのオセルタミビル
耐性株はザナミビルに対しては感受性を保持し
ていた。

3. 抗原性解析

シチメンチョウ赤血球を用いた HI 試験による
A/H1N1pdm 分離株およびオセルタミビル耐性株の
抗原性解析結果の代表例を表 3 に示した。国内分

離株については、ワクチン株 A/California/7/2009 フェレット抗血清に対する 8 倍以上の抗原変異株は現在までに 4 株検出され、出現頻度は 0.57% である。そのうち 1 株 (A/Shizuoka-C (静岡市) /172/2009) は 2009 年 5 月に検体採取されたオセルタミビル耐性株であった。

しかし、セルタミビル耐性株を含むほとんどの国内分離株の抗原性はワクチン株 A/California/7/2009 に類似しており、オセルタミビル耐性の抗原変異株は広がっていない。

4. NA 遺伝子系統樹解析

A/H1N1pdm 分離株の NA 遺伝子系統樹解析の結果からは、A/H1N1pdm 分離株の NA 遺伝子は国内株、海外株ともに季節性インフルエンザウイルスの NA 遺伝子のような明らかなクレード (3) を形成せず、V106I および N248D の共通のアミノ酸置換をもつ一群に分類された。オセルタミビル耐性株もこの一群に散在しており、特定のグループを形成する傾向は認められなかった。

5. 海外の耐性株検出状況

インフルエンザウイルス研究センターでは、2009/10 シーズンに海外分離株 170 株についてオセルタミビルおよびザナミビルに対する薬剤感受性試験を実施した。A/H1N1pdm 分離株に関しては、海外 5 カ国の 73 株について解析を行ったが、耐性株は検出されなかった。季節性 A/H1N1 分離株は世界的に分離報告数が非常に少ないが、ラオスで分離された 4 株はいずれもオセルタミビル耐性株であった。A/H3N2 分離株に関しては、中国および台湾分離株のそれぞれ 1 株で NA に D151D/G の混合配列が見られ、ザナミビルに対して 10~20 倍感受性が低下していた。B 型分離株は海外 5 カ国の 31 株について解析を行ったが、耐性株は検出されなかった。

一方、海外の WHO インフルエンザ協力センターからの情報では、南北アメリカ、中国、東南アジア諸国から収集した A/H1N1pdm 分離株の 1.1% (米

国 CDC 成績) が、欧州、アフリカ諸国からの分離株の 0.7% (英国センター成績) がそれぞれオセルタミビル耐性であり、わが国と同様に海外でもオセルタミビル耐性株は散発的に発生しているのみである。また、これら耐性株はすべてザナミビルに対しては感受性で、世界的にもザナミビル耐性株はまだ見つかっていない。

D. 考察

2008/09 シーズンには、北欧由来のオセルタミビル耐性の季節性 A/H1N1 株が世界中に広がり、わが国でもオセルタミビル耐性 A/H1N1 株の出現頻度は 99.6% に達した (3)。これらの耐性株の多くは、オセルタミビルの投与を受けていない患者から分離されており、ヒトからヒトへの感染伝播によって急速に広がったと考えられる。

一方、2009/10 シーズンにおけるオセルタミビル耐性 A/H1N1pdm 株の出現頻度は 1.13% と低い。本サーベイランスでは 6,000 株余りの分離株について調べたが、大半は無作為に抽出した株について解析を行った。しかし、本サーベイランス開始当初は、抗インフルエンザ薬投与患者や「重症化・死亡例」および薬剤投与後に耐性が疑われる事例を優先的に解析し、いち早く耐性株を捉えることも目的の一つであったことから、耐性株の出現頻度の評価に当たっては、一部はバイアスがかかっていることも考慮しなければならない。

しかし、今回の成績は、2007/08 シーズンに、北ヨーロッパ由来のオセルタミビル耐性季節性 H1N1 株が国内に侵入する以前の時期における、国内での耐性季節性 H1N1 株の検出頻度 (抗インフルエンザ薬投与前の患者からの分離株のみ) とほぼ同様であり (4、5)、特に増加傾向にはない。

さらに、オセルタミビル耐性株の大半が散発例であり、接触者への感染伝播もほとんど確認されておらず、地域的な広がりも生じていない。

H275Y 耐性マーカーをもつオセルタミビル耐性株は、薬剤感受性試験において IC50 値の上昇を示す。この臨床的意義について、わが国でもいくつか報告があるが、15 歳以下の小児ではオセルタ