

ド %

他喘息薬%	27.3	100.0	100.0	75.0	<0.001
酸素投与%	31.8	55.6	63.3	67.9	0.002
抗菌薬%	36.4	88.9	93.3	67.9	<0.001
入院～解熱時間	35	44	32	37	0.967
入院日数	4.9	6.8	8.4	7.6	<0.001

肺炎患者 58 例をステロイド投与 46 例、非投与 12 例に分けて比較すると、ステロイド投与群では喘鳴の見られるものが多く、SpO₂ が低く、酸素投与の必要な例の多いことが明らかとなった。すなわち、ステロイドは呼吸状態の悪い例で多く使われていた。

表 4 ステロイド投与・非投与群別の肺炎の特徴

	ステロイド非投与群 n=12	ステロイド投与群 n=46	P 値
喘鳴%	8.3	58.7	0.002
細菌感染合併%	25.0	52.2	0.093
体温-°C	38.2	38.6	0.261
SpO ₂ %	95.6	90	<0.001
WBC	6385	8200	0.024
LDH	255	270	0.687
CRP	2.69	1.16	0.154
抗ウイルス薬投与までの日数	1.8	2.0	0.589
他の抗喘息薬%	50.0	97.8	<0.001
抗菌薬%	50.0	89.1	0.006
酸素投与%	8.3	97.8	<0.001
入院から解熱までの時間	35.5	36.0	0.611
入院日数	7.7	8.2	0.607

Kaplan-Meier 法によるステロイド投与群と非投与群の比較をみると、入院から解熱までの時間 (図 1)、入院期間 (図 2)、ともにログランク検定では有意な差はみられなかった。この結果は、ステロイドの投与は肺炎の治療経過に悪影響を及ぼしてはいないことを示唆していると考えられる。

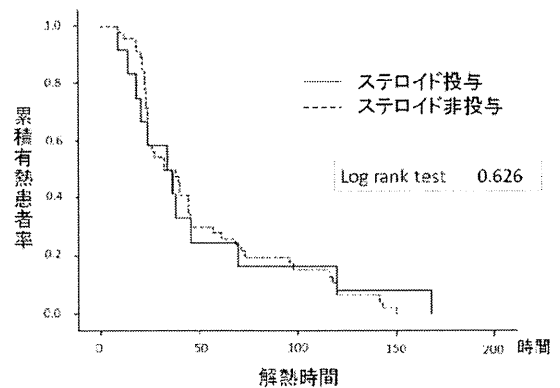


図 1 入院から解熱までの時間

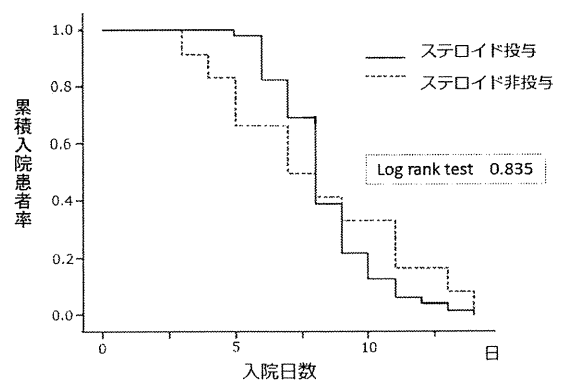


図 2 入院期間

インフルエンザ入院患者に全身性ステロイド投与を行った要因についてはロジスティック回帰分析を行い、その結果として、喘鳴あり、肺炎あり、SpO₂ 低下の 3 つの独立した因子が検出された (表 3)。

表 5 全身性ステロイド投与を行った要因

変数	係数	標準誤差	P 値	オッズ比	95% CI
切片	20.444	8.927			
喘鳴	2.401	0.841	0.004	11.03	2.12-57.33
肺炎	1.298	0.618	0.036	3.66	1.09-12.30
SpO ₂	-0.229	0.094	0.015	0.80	0.66-0.96

D. 考察

インフルエンザにより入院を要した患者数は、2009/10 のパンデミックシーズンと比べて、次の 2010/11 シーズンの方が明らかに少なかった。入院を必要とするに至った症状については、2010/11 シーズンでは 2009/10 シーズンと比べ、

呼吸器症状が原因である率はやや低いものの、最も頻度の高い入院理由であった。しかし、パンデミックでは最も多かった肺炎の頻度は、次シーズンでは57.6から27.6%に半減した。そして、これに呼応するように、入院時のSpO₂も2010/11シーズンの方が高い傾向がみられた。また、喘息の合併頻度は2010/11シーズンではやや減少し、しかもSpO₂は高く、入院日数は短い傾向がみられた。このことは、2010/11シーズンの方が肺炎にしても喘息にしても症状が軽いことを示唆している。その要因としては、型・亜型のなかで新型A/H1N1の頻度が減少したこととの関連性が考えられる。最重症であるICU入室者の率は5/104(4.8%)、2/43(4.7%)と著変なかった。2010/11シーズンの2名はいずれもA/H1N1であった。

2009/10シーズンの新型インフルエンザにより入院を必要とした症例群については、脳症など呼吸器以外の症状により入院した例、さらに超重症のICU入室例を除いた89例を対象として解析した。喘鳴を伴う肺炎例、伴わない肺炎例、喘鳴例、上気道感染症状例の4群に分けると、喘鳴群と喘鳴を伴う肺炎の2群では有意にSpO₂の低下がみられた。治療に関しては、喘鳴群と喘鳴を伴う肺炎群で、全身性ステロイドの投与、他の喘息薬の投与、抗菌薬の投与率が有意に高かった。全身性ステロイドは喘鳴を伴う肺炎では93.3%に投与されていたが、喘鳴のない肺炎でも64.3%に投与されていた。そこで、肺炎患者をステロイド投与群と非投与群に分けて検討すると、ステロイド投与群ではSpO₂が有意に低く、酸素投与率が有意に高い、すなわち、呼吸状態の悪いことが明らかとなった。しかし、ステロイド投与群では呼吸不全が強いのにもかかわらず、解熱時間、および入院日数に関してはステロイド非投与群との間に差はみられなかった。このことは、全身性ステロイドの使用はインフルエンザの治癒過程に悪影響を与えていないことを示していると考えられる。以上をまとめると、喘鳴を伴う肺炎患者において、全身性ステロイドの投与は、抗ウイルス薬の併用下において、肺炎に対するネガティブな効果は認められず、肺炎の重症化防止に役立った可能性が示唆された。

E. 結論

2010/11シーズンでは前年度のパンデミックシーズンと比べて、入院を要する肺炎の発症数が少なく、呼吸器合併症の重症度もより軽症である傾向がみられた。入院を必要とする喘鳴を伴う肺炎患者において、全身性ステロイドの投与は、抗ウイルス薬の併用下において、肺炎に対するネガティブな影響は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kudo K, Takasaki J, Manabe T, Uryu H, Yamada R, Kuroda E, Kobayashi N, Matsushita T. Systemic corticosteroids and early administration of antiviral agents for pneumonia with acute wheezing due to influenza A(H1N1)pdm09 in Japan. *PLoS ONE* 2012; 7(2):e32280.

2. 学会発表

- 1) Takasaki J, Manabe T, Uryu H, Yamada R, Jodai T, Kuroda E, Kobayashi N, Kudo K. Risk factors and successful treatment for hospitalized patients due to Pandemic H1N1 2009 in Japan. 4th Oxford Influenza Conference 2011 (Oxford, United Kingdom). Sept, 2011.
- 2) Takasaki J, Manabe T, Uryu H, Yamada R, Jodai T, Izumi S, Kuroda E, Kobayashi N, Kudo K. Risk factors and successful treatment approach for hospitalized patients due to Pandemic H1N1 2009 in Japan. 16th Congress of the APSR. (Shanghai, China). Nov, 2011.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

インフルエンザ心筋炎の全国臨床調査研究

研究分担者 浮村 聡 大阪医科大学内科学総合診療科 教授
研究協力者 和泉 徹 北里大学医学部長 循環器内科 教授
猪又孝元 北里大学循環器内科 講師
河上千尋 大阪医科大学 小児科 助教

研究要旨

2009/2010シーズン（大流行時）と2010/2011シーズン（大流行後）における新型インフルエンザ(H1N1pdm2009)心筋炎の発生頻度の比較検討のため、郵送による全国後ろ向き臨床調査研究を行った。調査対象は循環器専門医研修施設(976施設)であり、360施設から回答を得た。2009-2010シーズンの新型インフルエンザ心筋炎は25例、2010-2011シーズンは4例のみであった。このうち劇症型心筋炎については2009-2010が15例、2010-2011シーズンは2例のみであった。劇症型心筋炎17例中8例が死亡し、救命には体外式補助循環を必要とした。インフルエンザ心筋炎はパンデミックシーズンに比して次のシーズンでは大きく減少することが明らかとなった。

A. 研究目的

心筋炎は心筋を主座とした炎症性疾患である。インフルエンザは心筋炎の病因ウイルスの一つであるが季節性インフルエンザでは心筋炎の発生頻度は決して高くはないと考えられる。2009-2010シーズンにおけるインフルエンザ(A/H1N1pdm2009)による死亡198例のうち13例の死因が心筋炎であり、心筋炎は重要な合併症である。通常心筋炎急性期にその原因微生物を同定できることは稀であるが、インフルエンザ心筋炎においては迅速診断キットとRT-PCR法による病因診断とノイラミニダーゼ阻害薬による原因療法が行えることが他の心筋炎との大きな相違点である。

平成22年度は日本循環器学会と共同で後ろ向きのインフルエンザ心筋炎の全国臨床観察研究を行い、15例(男性10例、女性6例)の心筋炎患者が報告された(Circ J vol. 74, 2193-2199, 2000)。平均年齢は44歳、7例は基礎疾患を有さなかった。劇症型心筋炎が12例で、10例は体外補助循環を要し、8例で救命できた。さらに詳細な検討のため新型インフルエンザ心筋炎(H1N1pdm2009)の前向き全国観察のプロトコールを作成、日本循環器学会のホームページに掲載し、学会会員にニュースレターを用いて研究参加を呼び掛けたが、報告がなかった。

このような背景からインフルエンザH1N1pdm心筋炎はパンデミック時期にのみ発生が増加するという仮説を検証するため2009/2010シーズン(大流行時)と2010/2011シーズン(大流行後)におけるインフルエンザH1N1pdm2009心筋炎の全国後ろ向き観察研究を行った。

B. 研究方法

厚生労働科学研究費補助金『新型インフルエンザH1N1の病態把握と重症化の要因の解明に関する研究』研究班と日本循環器学会の新型インフルエンザ心筋炎特別調査委員会が共同で、2009/2010シーズン(大流行時)と2010/2011シーズン(大流行後)におけるインフルエンザ心筋炎比較の全国後ろ向き臨床観察研究を郵送にて行った。対象は循環器専門医研修施設(976施設)とし2011年9月に発送し2012年1月までに360施設から回答を得た。

またインフルエンザ心筋炎の発症機序の解明のためマウスのインフルエンザH1N1pdm2009心筋炎モデルを作成しコクサッキーウイルスB3心筋炎との比較検討を行った。7週齢雄のBalb/CマウスにインフルエンザH1N1pdm2009野生株(大阪公衆衛生研究所より分与)とインフルエンザウイルス/PR8/34(H1N1)を鼻腔に接種しインフルエンザ心筋炎を惹起し組織学的検討を行った。

心筋炎の診断は日本循環器学会の定めた「急性

および慢性心筋炎の診断・治療に関するガイドライン」に準じて行い、H1N1pdm2009の診断は、インフルエンザ迅速診断キット、RT-PCR法とその時期の疫学情報から総合的に診断した。

(倫理面への配慮)

本臨床調査研究は大阪医科大学での倫理委員会で承認を得、個人情報保護を行った。また感染動物実験については動物実験の委員会の承認を得るとともに感染動物実験専用の施設を用いた。

C. 研究結果

今回の調査で全国の360施設から回答を得た。2009/2010シーズンのインフルエンザ心筋炎(H1N1pdm2009)は25例(男性17例、女性8例、平均年齢40±20歳)であったのに対し、2010/2011シーズンは4例(男性1例、女性3例、平均年齢45±15歳)のみであった。心筋炎は生検あるいは剖検にて9例にて組織学的に確定診断が得られた。組織的には心筋細胞壊死、心筋細胞変性、炎症性細胞浸潤、間質浮腫、線維化などの所見を認めた。今回の新型インフルエンザ(H1N1pdm2009)心筋炎では、組織所見は比較的軽度であった。残りの症例はガイドラインに準じて臨床的に診断された。RT-PCR陽性であるか、インフルエンザA型が迅速診断陽性であることとその当時の疫学情報等からH1N1pdm2009感染症であると診断した。心筋生検1例、剖検1例で心筋組織を用いたRT-PCRを行ったがH1N1pdm2009陰性であった。

29例中16例において心症状(呼吸困難、胸痛、低血圧、失神など)がインフルエンザ様症状(発熱、咳、咽頭痛など)の発症後3日以内に出現した。一方で心症状が数週間持続し心不全で入院した症例や、いったんインフルエンザ様症状が軽快したのちに心肺停止や心不全で入院した症例など多彩な臨床像を示した。基礎疾患で最も多かったのは呼吸器疾患(喘息、慢性閉塞性肺疾患)の7例で基礎疾患がない心筋炎患者は15例であった。肺炎の合併を6例に認めた。

心電図変化についてはST-T変化が最も高頻度に認められるなど殆どの症例で認められた。致死的不整脈を7例で認めた。心不全合併例では胸部X線検査で心拡大や肺うっ血を認めた。血液検査ではCPK、トロポニンなどの心筋逸脱酵素の上昇を認めた。2例を除いて心臓超音波検査における心筋収縮力の低下を認め、死亡した8例と不完全な改善を示した2例を除き心機能は回復した。また

一部では心筋の浮腫を示す心筋壁肥厚や心膜液貯留を急性期に認め、その後回復した。冠動脈造影あるいはCTは18例で行われ冠動脈疾患は否定された。また心臓MRIは2例で行われたが、劇症型心筋炎の1例において心臓MRIT2強調画像において心筋炎病巣を反映すると考えられる高信号領域を認めたという報告を行った。

治療に関しては1例を除き抗インフルエンザ薬(オセルタミビルあるいはペラミビル)が早期に投与された。徐脈性不整脈に対して一時的ペースメーカー挿入が行われた。

劇症型は総計17例(男性12例、女性5例、平均年齢33±19歳)でそのうち8例が死亡した。2009/2010シーズンのインフルエンザ劇症型心筋炎は15例であったのに対し、2010/2011シーズンは2例のみであった。13例でIABPあるいはPCPSなどの体外式補助循環が単独ないし併用で使用され、このうち9例で救命でき4例が死亡した。非使用の4例は全例が死亡した。人工呼吸器は15例で使用された。

マウス心筋炎モデルにおいてH1N1pdm2009心筋炎の組織像は心膜直下あるいは血管周囲に限局した心筋炎病巣を認めるのみで病変は限局し、組織学的にはリンパ球浸潤が主体で季節性H1N1心筋炎と大きな差異は認めなかった。

D. 考察

心筋炎は循環器疾患の中では重篤だが発症頻度の少ない疾病である。また無症候性心筋炎は多発している可能性が考えられるが、生検標本がなければ確定診断はできず疫学的に発生率は不明で心筋炎の多数例を扱った臨床研究は乏しい。心筋炎の多くは細菌やウイルスなどの感染によって発症する。従来、急性心筋炎の原因ウイルスとしてコクサッキーB群ウイルスなどエンテロウイルス最も高頻度とされてきた。インフルエンザウイルスは心筋炎の病因ウイルスの一つであるが、欧州で624例の心筋炎患者の心筋生検からPCRでウイルスゲノムの検出を試みた報告でインフルエンザはわずか5例(0.8%)であり、季節性インフルエンザ流行期のインフルエンザ心筋炎の症例報告も少なく、インフルエンザは心筋炎を起しやすいウイルスとは考えにくい。

しかし、昨年度我々は15例のH1N1pdm2009心筋炎の検討を行い、欧米からも今回のパンデミック中の心筋炎合併についての報告が散見され、

H1N1pdm2009インフルエンザでは、季節性に比して心筋炎合併が高頻度である可能性が示唆された。またその後の前向き研究では心筋炎の報告がなく、インフルエンザH1N1pdm2009心筋炎はパンデミック時期のみ発生が増加するという仮説の検証のため今回2009/2010シーズン（大流行時）と2010/2011シーズン（大流行後）におけるインフルエンザ心筋炎の比較を行った。2009-2010シーズンのH1N1pdm2009インフルエンザ心筋炎は25例、2010-2011シーズンは4例のみであった。劇症型心筋炎に限ると2009-2010は15例、2010-2011シーズンは2例のみであった。従ってインフルエンザH1N1pdm2009心筋炎はパンデミックシーズンに比して次のシーズンでは大きく減少することがはじめて明らかとなった。

心筋炎の確定診断は心筋生検により行いうるが、今回のH1N1pdm2009インフルエンザでは、臨床的な重症度に比し組織所見は比較的軽度であった。またマウスのインフルエンザ心筋炎モデルもやはり組織所見は軽度でヒトと同様であり、インフルエンザウイルスの心臓親和性は高くないと考えられる。木戸らはマウスのインフルエンザ心筋炎発症にトリプシン2の活性化が関与し、その結果MMPやサイトカインが過剰発現し、抗トリプシン薬で抑制されると報告している。またインフルエンザ感染におけるサイトカイン過剰発現の中心は肺の血管内皮細胞で、上皮細胞ではないとの報告もあり、インフルエンザ感染によりトリプシンが心臓の血管内皮細胞で活性化し、それに引き続いておこる炎症性サイトカインがインフルエンザ心筋炎発症に強く関与するという仮説は有力と考えられる。2009/2010シーズンのインフルエンザ患者は約2061万人で死亡が198例、2010/2011シーズンは約1030万人で死亡が150人と報告されており、25例が4例というインフルエンザ心筋炎の減少はこれに比して大きい。また肺炎については2010/2011シーズンでは高齢者の二次性細菌性肺炎が死亡の増加の理由との分析もあり、2009/2010シーズンとは死亡例や重症例の内容が異なると考えられる。我々の施設では2009/2010シーズンには小児で呼吸器症状が先行するウイルス性肺炎の増加していることを報告し、さらに肺炎が2シーズンめでは軽症化した結果を得ているが、免疫を持たない状況での大流行時特有の生体の反応がウイルス性肺炎やウイルス性心筋炎発症に関与している可能性は高いと

考えられる。

今回の新型インフルエンザ心筋炎の臨床像については、インフルエンザ様症状発症後3日以内に発症し急激に悪化している症例が多く臨床的に注意が必要である。インフルエンザ症状が改善した後の亜急性期に発症した症例も認めるなど経過は多彩で、また29例中15例は合併症がなかったことから、大流行時には心筋炎の合併についての注意喚起が重要と考えられる。

診断において心電図変化は非特異的であるが、その変化の頻度は高くスクリーニングとして有用と考えられる。また新しい診断法としてMRIの有用性を示す報告が行われた。入院第4病日の劇症型心筋炎症例のMRIのT2強調画像にて後壁ならびに心尖部に高信号を認め、心筋炎の組織所見は軽く、MRIにて一過性の炎症性変化をとらえられる可能性が示唆された。

一方で小児の報告例は少なかった。この理由として、小児では心筋炎の発症そのものが少ないのか、あるいは小児において心電図や心臓超音波検査などが成人に比して行いにくいいため診断率が低いのが未解決の課題である。今後小児科循環器医を対象にこの課題解決のため後ろ向き観察研究や小児科医のインフルエンザ心筋炎に対する意識調査を行う必要性が考えられる。

今回はIABPやPCPSなどの体外補助循環を要した重症患者13例中、9例で救命でき、体外補助循環を使用しなかった劇症型では4例すべてが死亡した。従って心筋炎の急性期に急速な循環動態の悪化を認める場合は補助循環の使用を躊躇すべきでなく、循環器専門病院への速やかな紹介が必要と考える。通常心筋炎の急性期治療中に原因微生物を同定し、原因治療を行いうることは殆どない。その結果対症療法のみを行い、心筋障害の回復を待つのが通常である。本研究において治療面では1例を除き全例で原因治療としてノイラミニダーゼ阻害薬が投与された。一方で2002年の日本循環器学会主導の劇症型心筋炎の観察研究の報告によれば、体外補助循環を要した患者52例で救命できたのは30例で生存率57.7%であった。今回の生存率は69%であり、この研究と差はなくノイラミニダーゼ阻害薬投与が体外補助循環を要する劇症型心筋炎の生存率を向上させるという明らかな証拠は得られなかった。ただこれはノイラミニダーゼ阻害薬投与の有用性を否定するものではなく、心筋炎や肺炎発症という重症

化を未然に防いだ可能性も考えられる。インフルエンザ心筋炎に対する治療法として抗ウイルス療法、抗サイトカイン療法の両面から検証していく必要がある。

E. 結論

2009-2010シーズンの新型インフルエンザ心筋炎は25例、2010-2011シーズンは4例のみであった。H1N1pdm2009 インフルエンザ心筋炎はパンデミックシーズンに比して次のシーズンでは大きく減少することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Kawakami C, Murata T, Nitta M, T Higashiyama, Takahashi N, Ukimura A, Tamai H. Clinical Predictors of Pneumonia in Pandemic Influenza Virus Infection in H1N1pdm Pandemic Period. Bull of Osaka Medical College. 57(1): 9-16, 2011

② JCS Joint Working Group. (Chair: Izumi T) Guidelines for diagnosis and treatment of myocarditis (JCS 2009): digest version. Circ J. 75(3): 734-743, 2011

③ Takeuchi I, Imaki R, Inomata T, Soma K, Izumi T. MRI is Useful for Diagnosis of H1N1 Fulminant Myocarditis: Circ J. 74(12): 2758-2759, 2010

④ 浮村 聡, 神崎裕美子, 出口寛文. インフルエンザ感染と心筋炎. 呼吸と循環. 59 (4) :401-408, 2011

2. 学会発表

① 浮村 聡, 東山智宣, 鈴木 薫, 中野隆史, 村尾 仁: 新型インフルエンザ A(H1N1)2009 対策としてのオセルタミビル予防内服の副作用とワクチン接種の副反応に関する調査結果. 第85回日本感染症学会 2011年4月, 東京.

② 浮村 聡: パンデミック(H1N1)2009 によるインフルエンザ心筋炎の病像. 第59回日本化学療法学会, 2011年6月, 札幌.

③ Ukimura A, Izumi T: Myocarditis Associated

with Influenza A(H1N1)pdm in Japan: Featured research Session, The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Aug. 2-3, 2011 Yokohama.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表1 インフルエンザ心筋炎-1

	2009/2010 シーズン	2010/2011 シーズン
症例数	25	4
性別 (男/女)	17/8	1/3
年齢	39.4±20.9	44.8±14.9
予後 (生存/死亡)	19/6	2/2
成人/未成年	20/5	4/0
劇症型心筋炎 (成人/未成年)	15(10/5)	2(2/0)
心筋生検/剖検	10/3	0/1
IABP/PCPS 使用 (生存/死亡)	13(9/4)	2(0/2)
人工呼吸器使用 (生存/死亡)	17(11/6)	4(0/2)

表2 インフルエンザ心筋炎-2

	2009/2010 シーズン n=25	2010/2011 シーズン n=4
基礎疾患	喘息/肺気腫 6 (24%), 糖尿病 2 (8%), 基礎疾患なし 14(56%)	喘息 1, 拒食症 1, 基礎疾患なし 1
心症状	呼吸困難 13 (52%), 胸痛 4 (16%), CPA 2(8%)	呼吸困難 3 (75%), チアノーゼ 1
心電図変化	ST-T異常 16, 心室頻拍・細動 4 情報なし 2	上室頻拍 2, 情報なし 1
心臓超音波検査	壁運動異常 22, 異常なし 1, 情報なし 2	壁運動異常 3, 情報なし 1
CPK 最高値	12453±40222IU/L	8566±14187IU/L
冠動脈検査	正常 15, 施行せず/情報なし 10	正常 3, 施行せず 1
抗インフルエンザ薬	25 (100%)	4 (100%)

インフルエンザ流行における亜型の検討

研究分担者	池松 秀之	九州大学先端医療イノベーションセンター	臨床試験部門
研究協力者	河合 直樹	日本臨床内科医会インフルエンザ研究班	
	柏木 征三郎	日本臨床内科医会インフルエンザ研究班	
	岩城 紀男	日本臨床内科医会インフルエンザ研究班	
	廣津 伸夫	日本臨床内科医会インフルエンザ研究班	

研究要旨

2010-11年流行期はA(H1N1)pdmは新型インフルエンザではなく季節性インフルエンザとして扱われるようになったが、患者より分離されたウイルスはA(H1N1)pdm09が最も多く、次いでH3N2、Bであり、いわゆる混合流行であった。

2009-2010年流行期はA(H1N1)pdm09が10-19歳の年齢層で著しく患者が多かったが、2010-2011年流行期においては、その年代での患者数は減少していた。20歳以上の年齢層での報告数には大きな違いは認められなかったが、相対的にA(H1N1)pdm09での成人の占める割合が高くなっていった。

判定された型および亜型の情報は臨床情報の解析に利用され、また、各NA阻害薬の臨床効果が型および亜型別に解析された。

A. 研究目的

H21年（2009年）に世界中で流行しパンデミックの原因となった新型インフルエンザH1N1（以下A(H1N1)pdm09）が日本でも流行し、2009-2010年流行期に日本臨床内科医会インフルエンザ研究班で分離されたウイルスの100%がA(H1N1)pdm09であった。

2010-2011年流行期においては、このA(H1N1)pdm09とともにA(H3N2)型やB型の流行がみられている。

このように日本において流行するインフルエンザの亜型の分布様式は毎年変化している。しかし、インフルエンザ亜型における抗インフルエンザ薬の効果については十分な情報は得られていない。

日本臨床内科医会インフルエンザ研究班では、所属する全国約10数施設を中心に、インフルエンザと診断された患者について、臨床所見や発症日時、薬剤投与開始、発熱消失の各時点などがインターネット上で登録され、さらに鼻腔拭い、咽頭拭い、鼻腔吸引などの方法により検体が採取され、迅速診断キットだけでなく、ウイルス分離やPCRによる検査がなされている。

患者から分離されたウイルスの型・亜型を決定し、その情報を臨床データの解析に提供して、ウイルスの型・亜型と臨床症状との関連および抗インフルエンザ薬の効果との関連を明らかにする事を目的とした。また、分離されたインフルエンザウイルス株を用いて薬剤のin vitroの効果

(IC50)やH275Y変異の有無について検討を行うことにより、耐性ウイルスの出現に関する情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

2010-2011年のインフルエンザ流行期に、症例から採取された臨床検体より、ウイルスの分離培養を実施し、感染したインフルエンザウイルスの型・亜型を、抗血清を用いてHA法により確定する。亜型の判定に関しては、さらに型特異的なプライマーを用いてPCR法により同様に確定する。

また、治療後において、これらの症例から採取された臨床検体より、同様にウイルスの分離培養およびPCRを用いて、ウイルスの残存を検討した。

（倫理面への配慮）

被験者に対しては本研究の目的等を十分に説明し、文書または口頭で同意が得られた患者のみを対象とした。登録基本データはID、イニシャル、性別、生年月日とし、個人名や住所などの個人の特定につながる情報は記載しなかった。また、臨床検体については別にID番号を設定し、第三者が個人の特定をできないように配慮を行った。

C. 研究結果

(1) 2009-2010年流行期に分離されたウイルスは100%がA(H1N1)pdm09であったが、23年度5月までの2010-2011年流行期においては、A(H1N1)pdm09、H3N2、Bの混合流行でA(H1N1)pdm09

が最も多く、次いで H3N2、B であった (図 1)。

(2) 年齢別にみると、2009-2010 年流行期は A(H1N1)pdm09 が 10-19 歳の年齢層で著しく患者が多かったが、2010-2011 年流行期においては、その年代での患者数は減少していた。20 歳以上の年齢層での報告数には大きな違いは認められなかった。結果として 2010-2011 年流行期は A(H1N1)pdm09 での成人の占める割合が高くなっていた。

(3) オセルタミビルに対する IC_{50} 値が著しく高いウイルスが 2 例より分離されており、この 2 例はペラミビルに対する IC_{50} も高値を示していた。その NA の部分塩基配列を決定したところ H275Y 変異が確認された。

D. 考察

2009-2010 年流行期は A(H1N1)pdm09 以外の A 型の亜型のウイルスはほとんどみられず、前年度のオセルタミビル耐性 A(H1N1)型(ソ連型)や H3N2 型ウイルスは消失の可能性もあると考えられた。しかし、2010-2011 年流行期においては、オセルタミビル耐性 A(H1N1)型は分離されなかったが、H3N2 型が再び分離されるようになった (図 1)。H3N2 は今後も流行を続けるのではないかと思われた。

2009-2010 年流行期は分離されたウイルスは全部 A(H1N1)pdm09 であり、その年齢分布をみると 10-19 歳の患者が非常に多かった。一方、2010-2011 年流行期に A(H1N1)pdm09 が分離された患者の年齢分布をみると、前年度に比較して 10-19 歳の患者割合が大きく低下していた (図 2)。10-19 歳の割合の低下はこの年齢層での感染者の減少が大きな原因であり、他の年齢層の感染者が増えていたためではなかった (図 3)。10-19 歳での流行前の A(H1N1)pdm09 に対する HI 抗体価 40 倍以上の率が高いことが報告されており、この年齢層における感染者の減少に関連のある要因であったかもしれない。

NA 阻害薬に対する耐性ウイルスの出現は非常に重要な問題であるが、2010-2011 年流行期には、A(H1N1)pdm09 にのみオセルタミビルに対する IC_{50} 値が著しく高いウイルスが 2 株分離されたのみであり、治療薬の選択に与える影響は大きくないと思われた。

ウイルスの型・亜型による臨床症状の差や各 NA 阻害薬の臨床効果に違いがみられるかは興味深い点である。今年度も決定された亜型は各 NA 阻

害薬の臨床効果やその他の解析に用いられ有用な情報が得られている (河合報告参照)。

E. 結論

(1) 2010-2011 年流行期に患者より分離されたインフルエンザウイルスの型・亜型は、A(H1N1)pdm09 が 47.7%、H3N2 が 25.0%、B が 27.3%であった。

(2) 2010-2011 年流行期は 0-9 歳、10-19 歳の年齢層での A(H1N1)pdm09 に感染した患者が 2009-2010 年流行期と比較して少なかった。

(3) 2010-2011 年流行期に患者より分離されたインフルエンザウイルスの中で、A(H1N1)pdm09 にのみオセルタミビルとペラミビルに対する IC_{50} 値が著しく上昇したウイルスが 2 株分離され、NA の部分塩基配列の解析により H275Y 変異の存在が確認された。

(4) ウイルスの亜型の情報は各 NA 阻害薬の臨床効果やその他の解析に用いられ有用な情報が得られた (河合報告参照)。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①池松秀之：吸入型抗インフルエンザ薬ザナミビルの吸入後早期における臨床効果の検討—無作為化オープンラベル試験 日本臨床内科医会誌：26:215-219, 2011
- ②Ikematsu H, Kawai N, Kashiwagi S. In vitro neuraminidase inhibitory activities of four neuraminidase inhibitors against influenza viruses isolated in the 2010-2011 season in Japan. J Infect Chemother in press 2012
- ③河合直樹、廣津伸夫、池松秀之. インフルエンザ診療マニュアル 2011-2012 年シーズン版. インフルエンザ研究班編集 (柏木征三郎、岩城紀男監修). 日本臨床内科医会誌 26 巻 2 号臨時付録, 2011

2. 学会発表

- ①池松秀之：インフルエンザにおける迅速診断キットの成績と HI 抗体価測定の成績. 第 25 回日本臨床内科医学会, 2011 年 9 月, 札幌.
- ②池松秀之：2010/11 年シーズンのインフルエン

ザウイルス株に対する抗インフルエンザウイルス薬の感受性について、第81回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2011年10月、北九州。

- なし
- 2. 実用新案登録
- なし
- 3. その他
- なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

図1 2流行期における分離されたインフルエンザウイルスの型・亜型別頻度

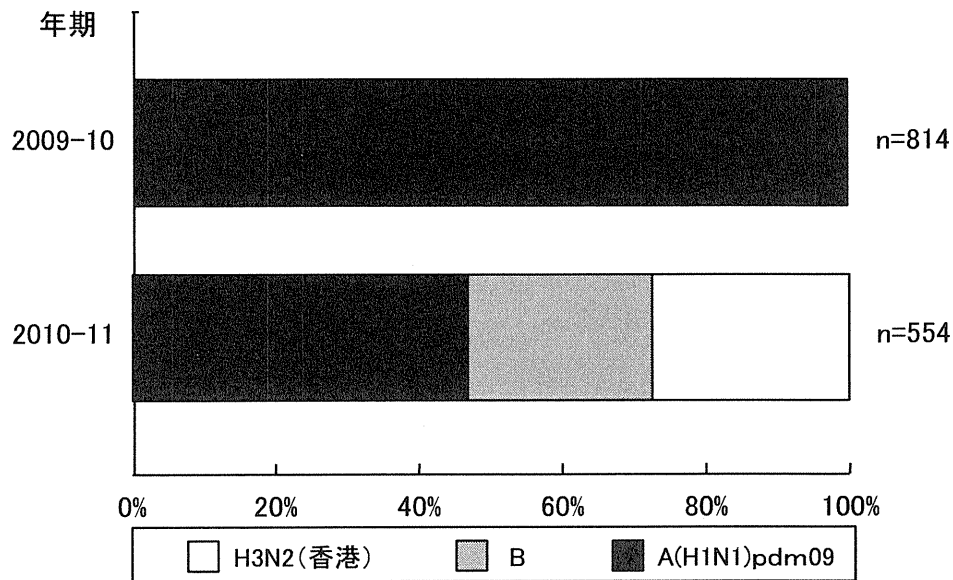


図2 2流行期におけるウイルス亜型別の患者の年齢分布

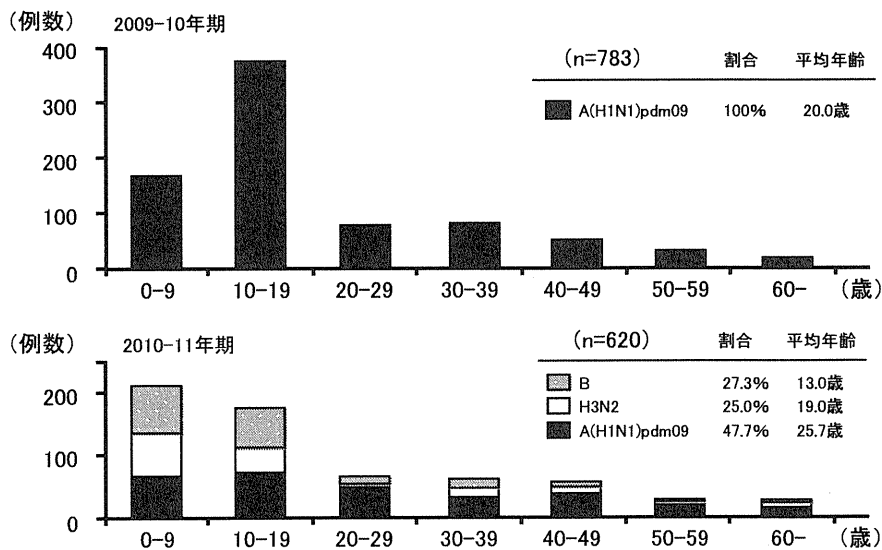
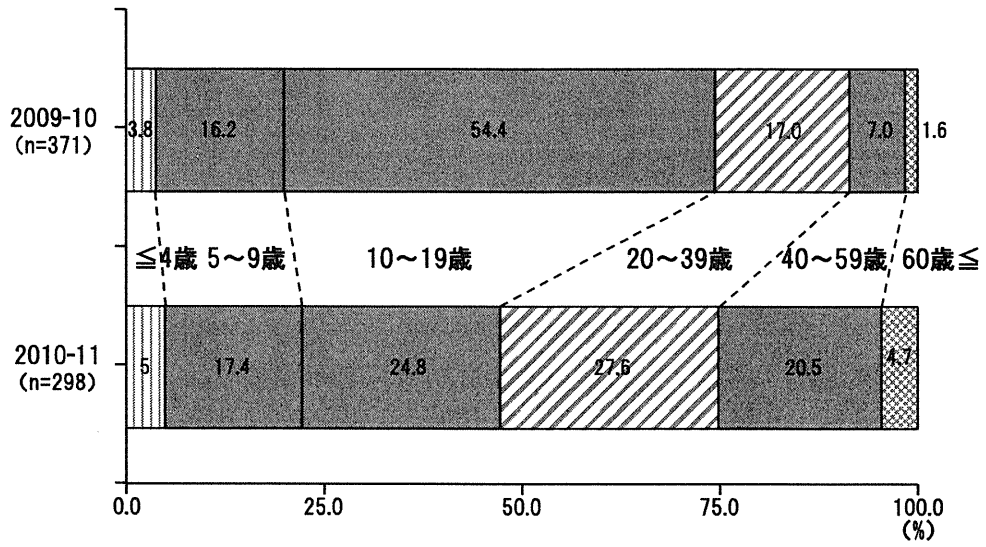


図3 2流行期におけるA(H1N1)pdm09型が分離された患者の年齢分布



2010-11 年シーズンのインフルエンザ各亜型における症状の解析 ならびに抗インフルエンザ薬の使用状況と有効性に関する研究

研究分担者 河合 直樹 日本臨床内科医会インフルエンザ研究班長
研究協力者 池松 秀之 九州大学先端医療イノベーションセンター特任教授
柏木 征三郎 日本臨床内科医会インフルエンザ研究班
岩城 紀男 日本臨床内科医会インフルエンザ研究班
廣津 伸夫 日本臨床内科医会インフルエンザ研究班

研究要旨

A(H1N1)pdm は 2010-11 年シーズン後に季節性化したことが宣言された。またこの 2010-11 年シーズンは A(H1N1)pdm09 以外に従来型の季節性 A(H3N2) や B も流行し混合流行であった。本研究ではパンデミックから季節性に移行する過程の A(H1N1)pdm09 と従来の季節性 A(H3N2)、B と症状を比較するとともに、このシーズンの NA 阻害薬の使用状況と有効性を検証した。最高体温や全身症状の保有率はこのシーズンの A(H1N1)pdm09 の方が A(H3N2) や B よりも高い傾向が示された。また使用された NA 阻害薬は年齢層によってかなり異なった。NA 阻害薬 4 剤の投与後の解熱時間は A(H1N1)pdm09 で最も短く、B で最も長い傾向がみられ、いずれの薬剤の IC_{50} も A(H1N1)pdm09 で低く、B は高い傾向にあったことと比較的一致した。また NA 阻害薬の有効性には NA 阻害薬の種類よりも(亜)型が大きく影響すると考えられた。

A. 研究目的

A(H1N1)pdm09 は 2010-11 年シーズンを最後に季節性化した。この 2010-11 年シーズンは他の季節性インフルエンザ A(H3N2)、B 型も流行する混合流行で、かつ従来のオセルタミビル、ザナミビルに加えて初めてラニナミビル、ペラミビルもシーズンを通して使用し比較できたシーズンでもあった。ここでは、2010-11 年シーズンにおいて、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B の 3 型の症状を比較するとともに、このシーズンのノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬の使い分けの状況、ならびに各亜型における各 NA 阻害薬の有効性の検討を行った。

B. 研究方法

2010-11 年シーズンにおいて流行したインフルエンザ症例について、別途池松らが報告する PCR の検討結果に基づいて、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B の 3 群に分け、以下の①～③について検討した。①各(亜)型群における最高体温(罹患中最も高かった体温)、および迅速キットによる診断確定時における各症状(39℃以上の発熱、咳、鼻水、筋肉痛、食欲不振、倦怠感)の保有率を全年齢および年齢層別に検討した。②キットによりインフルエンザと診断された患者における NA 阻害薬の

使用状況を調査した。③各ウイルス型、薬剤における薬剤感受性(IC_{50})、解熱時間(投薬開始～解熱)を検討し、かつ解熱時間等に対する影響因子(亜型、最高体温、発症～投与開始までの経過時間、ワクチン接種回数、年齢、性別、前年のインフルエンザ罹患の有無、NA 阻害薬の種類)を検討した。

(倫理面への配慮)

各研究における登録基本データは ID、イニシャル、性別、生年月日とし、個人名や住所などの個人の特定につながる情報は記載しなかった。また被験者に対しては本研究の目的等を十分に説明し、文書または口頭で同意が得られた患者のみを対象とした。

C. 研究結果

①最高体温を 15 歳以下と 16 歳以上に分け各(亜)型別に比較したところ、16 歳以上では各(亜)型で大差はなかったが、15 歳以下では 39℃ 超の患者割合は A(H1N1)pdm09 が 71.6% と最も高く、以下 A(H3N2) の 45.5%、B 型の 33.3% の順であった(図 1)。また 15 歳以下では最高体温の平均±SD 値は A(H1N1)pdm09 (39.3±0.6℃) では H3N2 (39.0±0.7℃) や B (38.9±0.5℃) よりも

有意に高かった (各々 $p < 0.01$, $p < 0.001$) (図 2)。

診断確定時に A(H1N1)pdm09 では、咳、筋肉痛、倦怠感などの全身症状の保有率は各々、90.5%、46.7%、75.4%と、H3N2 や B よりも有意に高く、一方、鼻水の保有率は 59.8%と H3N2 (81.3%) よりも有意に低かった (図 3)。

②本研究登録患者での NA 阻害薬の使用状況は図 4 に示すように年齢層で大きく異なった。すなわち、9 歳以下と 60 歳以上ではオセルタミビルが最も多く使用され、10 歳代はザナミビル、ついでラニナミビルが多く使用された。また 20～59 歳ではラニナミビルが最も多く使用され、ついでオセルタミビルが使用された。

③各(亜)型において、各 NA 阻害薬に対する IC_{50} 値と、いずれかの NA 阻害薬を使用した症例における解熱時間の平均値を図 5 に示す。解熱時間は 4 種類の NA 阻害薬ともに A(H1N1)pdm09 で最も短く、オセルタミビル、ラニナミビルでは B で最も長い傾向が示された。また IC_{50} はザナミビル、ペラミビル、ラニナミビルのいずれでも A(H1N1)pdm09 で最も低く、B で最も高かった。オセルタミビルでは IC_{50} は A(H3N2) で最も低い傾向にあったが A(H1N1) もそれほど遜色がなかった。解熱時間に有意に影響する影響因子は(亜)型、最高体温であり、発熱時間 (発症～解熱) に有意に影響する因子としてはこの 2 因子にさらに発症～投与開始までの経過時間が加わったが、NA 阻害薬の種類を含めた他の因子は有意な影響を示さなかった (表 1)。

D. 考察

われわれは平成 21 年度の本研究班報告書において、2009-10 年シーズンに流行した A(H1N1)pdm09 の症状は前 2 シーズン (2007-08、2008-09) の A(H1N1) ソ連型と比較して、各症状の保有率は同じか低い傾向にあることを示した。しかし今回の 23 年度の研究では A(H1N1)pdm09 患者の最高体温や全身症状の保有率等が従来の季節性の A(H3N2) や B よりもむしろ高いことが示唆された。同じウイルス (亜) 型でもウイルス増殖 (ウイルス量) やサイトカイン産生等がシーズンや年齢層などで異なることも考えられ、さらに今後の検討が必要と思われた。

NA 阻害薬は小児や高齢者では吸入が困難なことからオセルタミビルが主に使われ、10 代ではオセルタミビルが原則使用禁となっていること

か逆に吸入薬が主に使用された。多忙な 20～59 歳の壮年層では 1 回吸入で治療が完結し服薬コンプライアンスの問題が生じないラニナミビルが多く使用された。

IC_{50} は A(H1N1)pdm09 で低く、B で高い傾向にあり、これは解熱時間が A(H1N1)pdm09 で短く、B で長い傾向にあることとほぼ一致すると思われた。またこの解熱時間には NA 阻害薬の種類よりも、(亜)型や最高体温の方が有意な影響を示すことが示唆された。なお発熱時間は発症から投薬開始までの経過時間が最も大きく影響しており、早期診断、早期治療の重要性が示された。

E. 結論

A(H1N1)pdm09 は 2010-11 年シーズン末に季節性化した。この 2010-11 年シーズン、A(H1N1)pdm09 の症状は他の季節性インフルエンザ A(H3N2) や B よりも強かった可能性が示唆された。また一方で A(H1N1)pdm09 は A(H3N2) や B よりも全般的に NA 阻害薬の効果が高いことも解熱時間や IC_{50} の成績から示された。ただし今後、ウイルスの変異によっては NA 阻害薬の効果が損なわれる事態が起きる可能性も否定出来ず、今後も慎重に動向を追う必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① [Kawai N](#), Ikematsu H, Iwaki N, Kondou K, Hirotsu N, Kawashima T, Maeda T, Tanaka O, Doniwa KI, Iwakuni O, Egashira K, Yamaji K, Kashiwagi S. Persistence of pandemic influenza H1N1 virus in young patients after oseltamivir therapy in the 2009-2010 season : a comparison with seasonal H1N1 with or without H275Y mutation. J Infect Chemother. 2011 Dec 23. (DOI 10.1007/s10156-011-0314-2)
- ② [河合直樹](#), 岩城紀男, 池松秀之, 柏木征三郎. 近年の H1N1 型の症状経過とウイルス学的検討. H1N1pdm を中心として. インフルエンザ 12:157-163, 2011.
- ③ [河合直樹](#), 池松秀之, 柏木征三郎. 2010-2011 年インフルエンザ流行状況と治療の有効性.

Clinic Magazine506:9-13, 2011.

- ④河合直樹、廣津伸夫、池松秀之. インフルエンザ診療マニュアル 2011-2012 年シーズン版. インフルエンザ研究班編集 (柏木征三郎、岩城紀男監修). 日本臨床内科医会誌 26 卷 2 号臨時付録, 2011.
- ⑤河合直樹. インフルエンザの流行状況とワクチン、抗インフルエンザ薬の有用性について. 日本臨床内科医会誌 26(4):101-106, 2011.
- ⑥河合直樹、池松秀之、柏木征三郎. インフルエンザ診療マニュアル 2011-2012 年シーズン版. Guideline digest vol. 51.
- ⑦河合直樹、池松秀之、柏木征三郎. 今シーズンにおける抗インフルエンザ薬の使い方. 日経メディカル 2012 年 1 月号 141-143.

- 2. 学会発表
 - ①河合直樹. インフルエンザの流行状況とワクチン、抗イ薬の有用性について. 第 25 回日本臨床内科医学会, 札幌, 2011 年 9 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

図1. 過去3シーズンのH1N1例におけるオセルタミビル投与後の体温経過 (毎日の最高体温の平均)

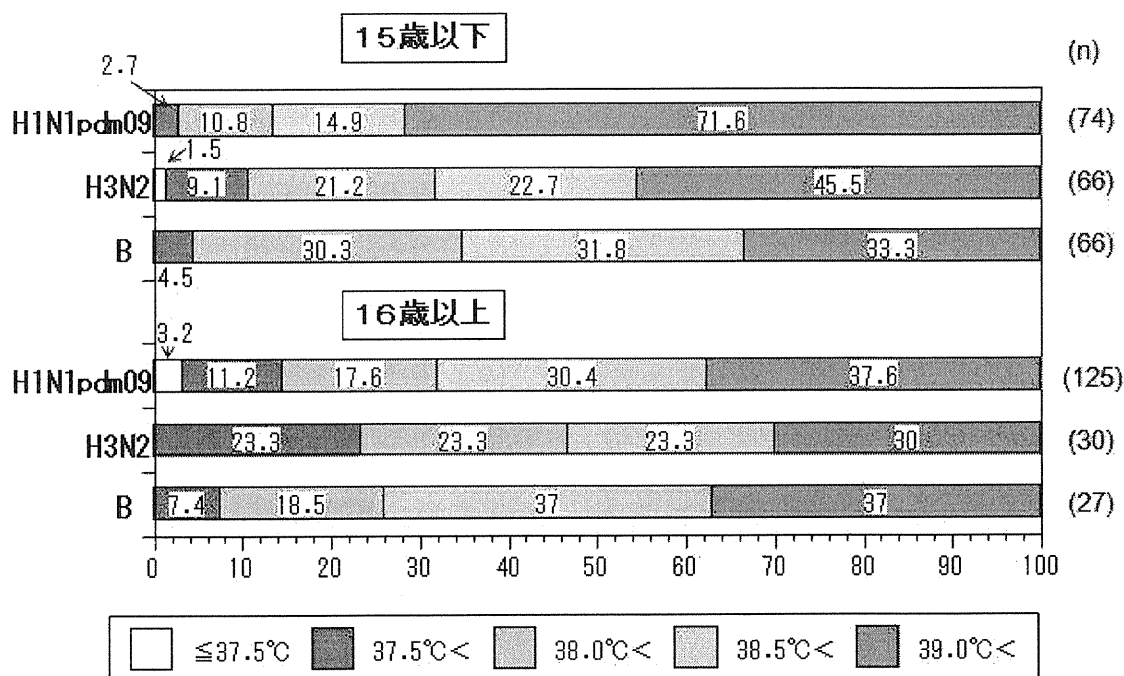


図2. 2010-2011年シーズンの各亜型における最高体温

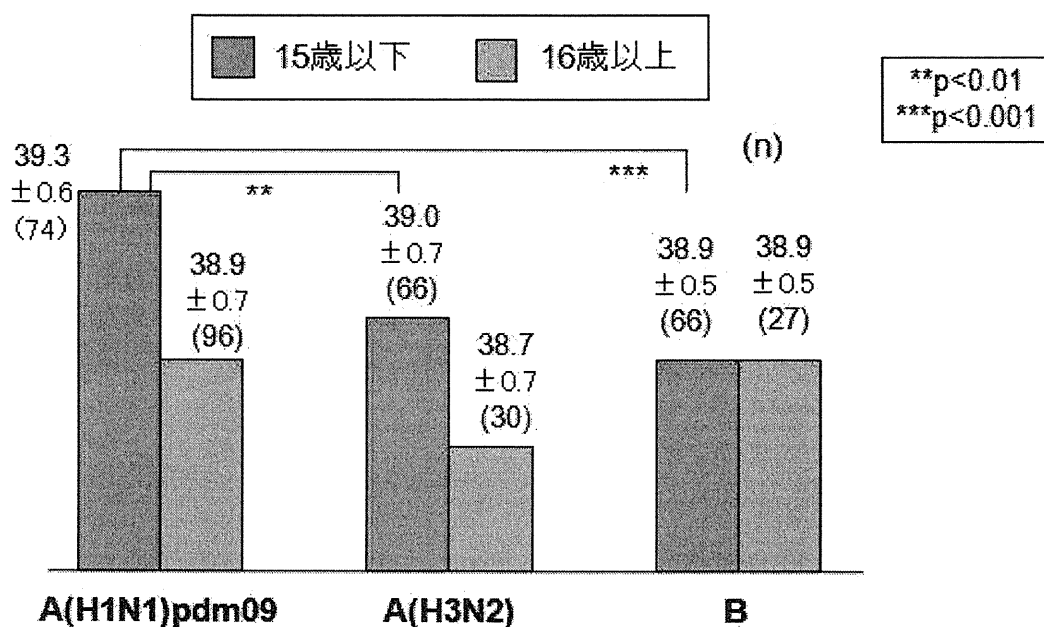


図3. 2010-2011年シーズンの各亜型における症状保有率（全年齢）

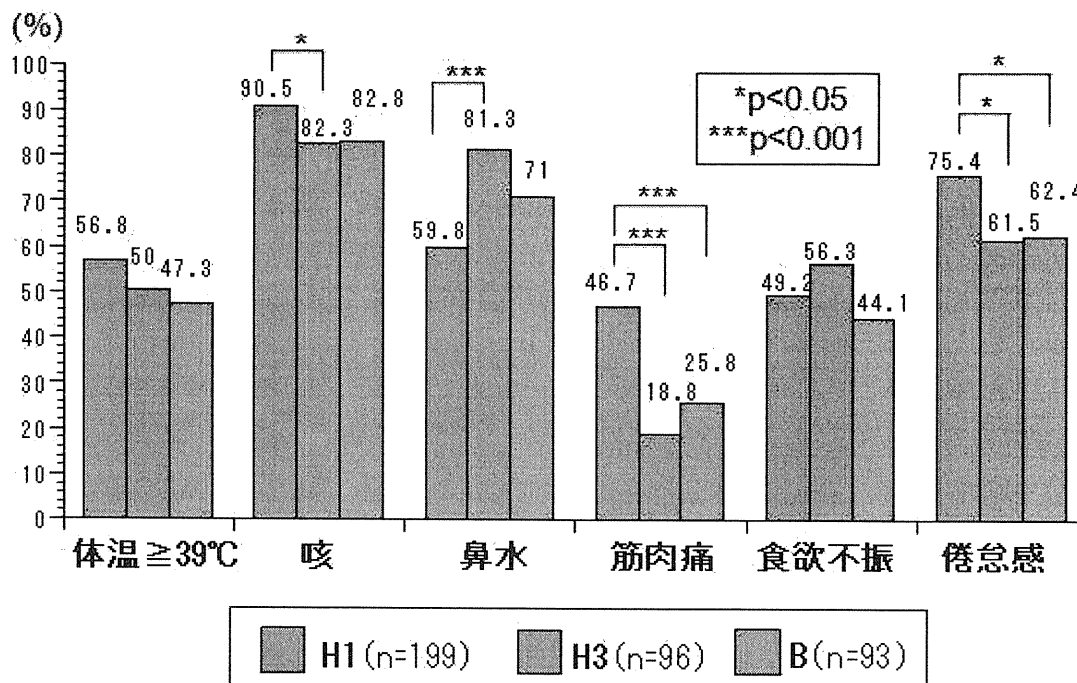


図4. 各年齢層における抗インフルエンザ薬の使用状況

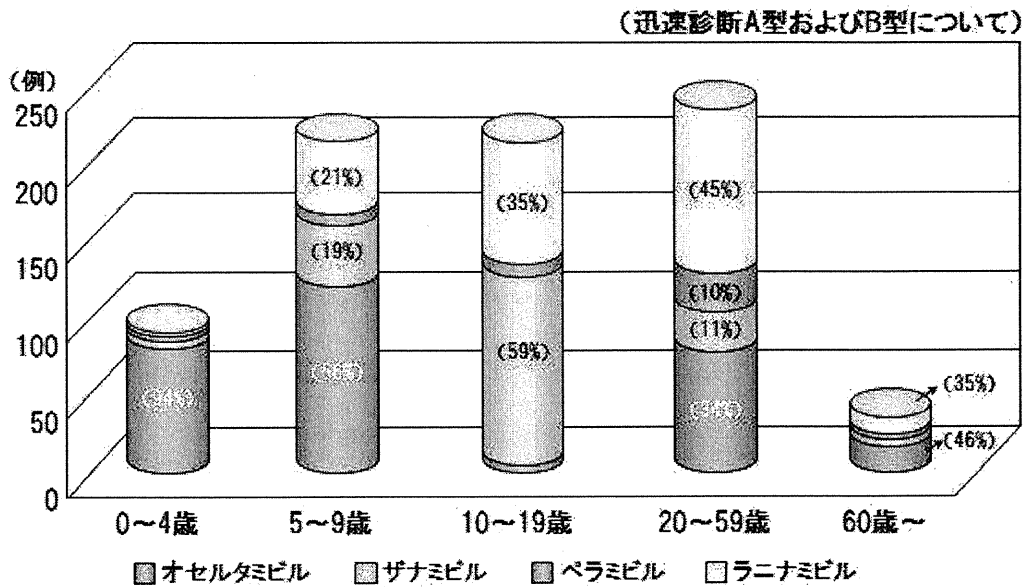


図5. 各亜型における平均の解熱時間と IC₅₀

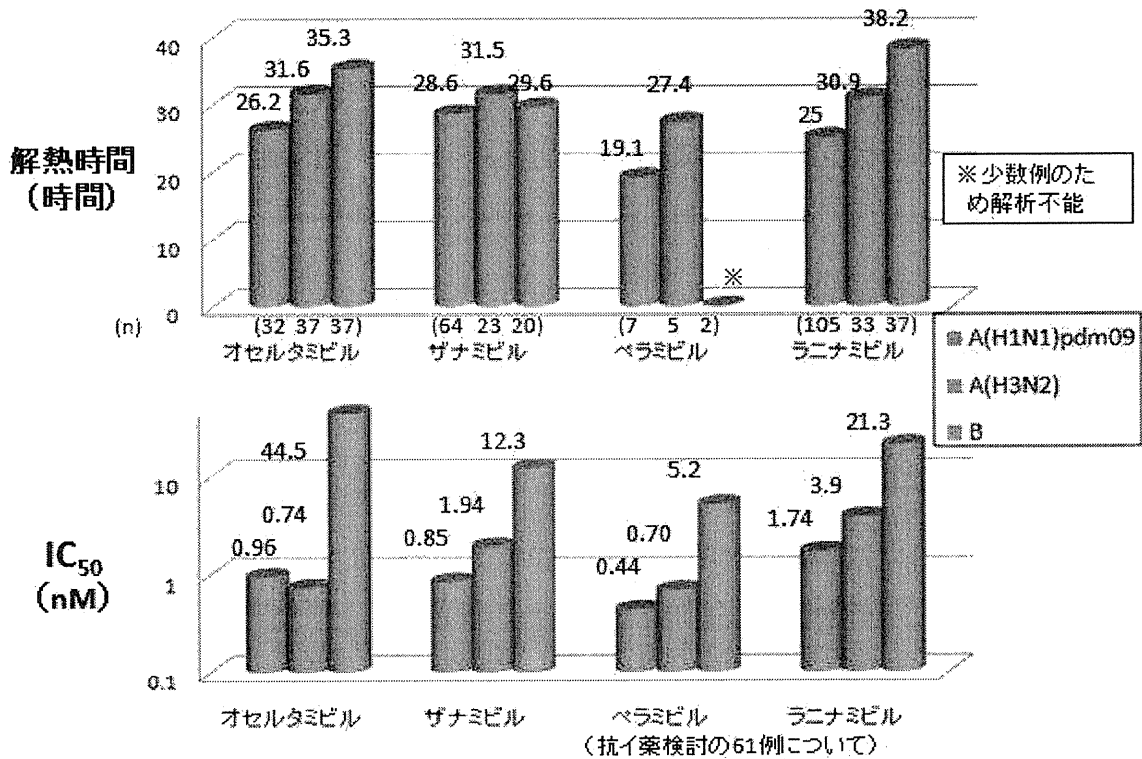


表 1. 解熱時間、発熱時間に及ぼす影響因子 (重回帰分析結果)
 (B 型でのザナミビルとペラミビル使用例はまだ少数のため省略)

パラメーター	t 値	p 値
解熱時間		
亜型(PCR結果)	3.63	0.00033
最高体温	3.49	0.00055
発熱時間		
発症～投与開始(時間)	11.2	2.1×10^{-25}
最高体温	3.60	0.00036
亜型(PCR結果)	3.49	0.00054

いずれもワクチン接種回数、年齢、性別、昨年インフルエンザ罹患、抗イ薬の種類はNS、
 さらに解熱時間は発症～投与開始間隔(時間)もNS

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

2009-2012 年本邦におけるインフルエンザ流行と薬剤耐性

研究分担者	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
研究協力者	クライド・ダパット	新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野
	イゾルデ・ダパット	新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野
	近藤大貴	新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野
	菖蒲川由郷	新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野
	齋藤孔良	新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野
	鈴木 宏	新潟青陵大学
	日本サーベイランスグループ*	

研究要旨

本研究では、2009-2010 年、2010-2011 シーズンに日本各地から採取し、分離したインフルエンザウイルス株の薬剤耐性、及び耐性変異の解析を行った。2009-2010 年シーズン、2010-2011 年シーズンに日本各地の病院または医院を受診したインフルエンザ様疾患患者の初診時検体から分離、培養したウイルスの型別、亜型判定を行い、その後 4 種類の NA 阻害剤の薬剤感受性試験 (IC₅₀ 値) を行った。その後、定義したはずれ値を超えたウイルス分離株を耐性と判定し、そのオリジナル臨床検体については NA 遺伝子におけるシーケンス解析を行った。2009-2010 年シーズンの A/H1N1pdm は、NA 阻害試験により 2 株が軽度のはずれ値を示した。この 2 株にはそれぞれ NA 遺伝子に I221T 変異と M241I 変異が確認された。また、2010-2011 年シーズンには、A/H1N1pdm の初診時株に 5 株、A/H3N2 に 2 株の薬剤耐性株が確認された。その中で、オセルタミビル耐性 H274Y 変異をもつウイルス株は、A/H1N1pdm で 2 株確認された。A/Hyogo/10K291/2011 株は、ペラミビル、オセルタミビルに対して最も高いはずれ値を示し (各 IC₅₀ 値 : 37.09nM、443.95nM)、ザナミビルに対してもわずかではあるがはずれ値を示した (IC₅₀ 値 : 0.54nM)。また、A/Kyoto/10K124/2011 株もペラミビルとオセルタミビルに対して、高いはずれ値を示した。患者にはオセルタミビルもペラミビルも投与されておらず限定的な伝播感染が疑われたが感染源は不明である。今後も、薬剤耐性サーベイランスを継続して行う必要があると考えられる。

2011-2012 年シーズンにおいて、北海道、新潟、群馬、東京、京都、大阪、兵庫、長崎の 8 都道府県 16 の病院または医院から採取された合計 1192 件の臨床検体から分離されたインフルエンザ陽性検体中、A 型が 323 件で全て H3N2 亜型だった。B 型は 317 件で、そのうち 299 件では HA 遺伝子がビクトリア系統、NA 遺伝子が山形系統のリアソータントであり、18 件が HA、NA 遺伝子共に山形系統のウイルスであった。また、培養検体のみでの検査結果ではあるが、A 型/H3N2 と B 型の両方で陽性の培養検体が大阪を除く全ての県で確認された。各都道府県のインフルエンザ陽性培養検体総数における A 型/H3N2、B 型の両方陽性の培養検体の割合は 1-16%と地域差があったが (平均 5%)、東京では 16% (4/35)、北海道では 15% (3/20) と比較的高く、逆に兵庫では 2% (1/49)、京都では 1% (2/140) であった (2012 年 3 月 29 日現在)。

A. 研究目的

我々は 2005 年より全国各地の臨床医と協力し、本邦に於けるインフルエンザの流行状況、流行株の遺伝子疫学的特徴、薬剤耐性頻度と遺伝子解析、耐性株による薬剤治療への影響を検討してきた。これまで、我々の調査で 2008-2009 年シーズンにはオセルタミビル耐性株に対してオセルタミビル治療をした際には治療効果が減弱することが我々の調査で判明した。2009-2010 年には日本各地で発生した新型インフルエンザは NA 阻害剤に対して感受性株であったことも

見いだした。

今回、我々は 2009-2010、2010-2011、2011-2012 年シーズンの本邦に於けるインフルエンザの薬剤耐性の頻度について調査を行ったため、報告する。

B. 研究方法

2009-2010 年インフルエンザシーズンに 6 府県 (福島、新潟、群馬、京都、兵庫、長崎)、2010 年 12 月-2011 年 3 月に、7 道府県 (北海道、新潟、群馬、京都、大阪、兵庫、長崎) の 13 医

療機関（内科・小児科）において、インフルエンザ様疾患で受診した患者に対し、迅速診断キットを用いてインフルエンザのスクリーニングを行った。十分な説明を行った後、初診時の患者の鼻腔ぬぐい・鼻腔吸引液または鼻腔・咽頭ぬぐい液を採取し、性、年齢、受診日などについて記録をした。新潟大学に輸送後、MDCK細胞を用いてウイルス培養を行い、培養陽性の検体から、リアルタイムPCRを用いてインフルエンザの型・亜型を決定した。採取したウイルスについて、アマンタジン耐性のマーカーであるM2蛋白Ser31Asnの遺伝子変異を、H1N1pdm亜型についてはオセルタミビル耐性のマーカーであるNA遺伝子His275Tyr(His274Tyr)変異を検出した。

選択した株で、オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビルに対してMUNANAを用いた蛍光法によるNA阻害剤感受性検査を行った。各シーズン、各型・亜型、4剤の薬剤毎に、ウイルス株のIC₅₀値から外れ値を定義し、その値を超えたものを耐性と判定した。外れ値の計算法は、第1四分位点(25%タイル)と第3四分位点(75%タイル)を算出し、第1四分位点から第3四分位点までの範囲である四分位範囲(IQR)を求めた。はずれ値の定義は、各型・亜型に対する75%タイル+IQRの3倍より高いIC₅₀値をはずれ値とした。

NA阻害剤に対する耐性変異に関しては、NA阻害試験ではずれ値を示したウイルスは、分離株とその臨床検体のオリジナル株の双方について遺伝子シーケンスを行い耐性に関連するアミノ酸変異を推測した。

(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、各医療機関にて患者及保護者に十分な説明を行い、新潟大学医学部倫理委員会にて承認を受けている。

C. 研究結果

2009-2010年シーズンに6府県(福島、新潟、群馬、京都、兵庫、長崎)の病院または医院から733株の臨床検体を採取した。臨床検体から分離した601のウイルス株は、全てA/H1N1pdmであった(表1)。2010-2011年シーズンに7道府県(北海道、新潟、群馬、京都、兵庫、大阪、長崎)

の病院または医院に受診した患者から1278株の臨床検体を採取した。分離した972株のウイルス株は、A型では、A/H1N1pdmが414株、A/H3N2が525株、B型が33株であった(表1)。

リアルタイムPCRサイクリングプローブ法を用いた薬剤耐性ウイルスのスクリーニングに関しては、2009-2010年のA/H1N1pdmでは、オセルタミビル耐性に相当するNA遺伝子275位の変異His→Tyrを持つ株は確認されなかった。A/H3N2は全てM2蛋白31位にSer→Asnの変異が検出されアマンタジン耐性であった。

2010-2011年シーズンに分離したA/H1N1pdmは、414株中2株(0.48%)にH275Y変異をもつオセルタミビル耐性株がみられた。

更に、2009-2010年に分離したA/H1N1pdm601株中57株と、2010-2011年シーズンに当教室で分離したA/H1N1pdmの414株中60株、A/H3N2の525株中59株、B型の33株中18株について4種類のNA阻害剤(ペラミビル、オセルタミビル、ザナミビル、ラニナミビル)に対して、NA阻害試験を行った(表2)。

2009-2010年シーズンのA/H1N1pdmは、ペラミビルが一番低い平均IC₅₀値を示し(IC₅₀値:0.07nM)、ラニナミビル、ザナミビル、オセルタミビルの順に平均IC₅₀値が高くなった(各IC₅₀値:0.24nM、0.69nM、1.88nM)(表2、図1)。

同様に、2010-2011年シーズンのA/H1N1pdmとA/H3N2はペラミビルに対して一番低い平均IC₅₀値を示し(A/H1N1pdm各IC₅₀値:0.12nM、H3N2:0.17nM)、ラニナミビル、ザナミビル、オセルタミビルの順に平均IC₅₀値が高くなった(A/H1N1pdm各IC₅₀値:0.27nM、0.63nM、1.37nM、A/H3N2各IC₅₀値:0.65nM、0.63nM、0.73nM、表2)。

B型はペラミビル、ラニナミビル、オセルタミビル、ザナミビルの順に平均IC₅₀値が高くなった(各平均IC₅₀値:2.31nM、8.44nM、27.09nM、53.74nM)。なお、B型はA型より高い平均IC₅₀値を示した(表2、図2)。

2009-2010年シーズンにNA阻害試験で、はずれ値を示したA/H1N1pdmは2株であった(表3)。A/Fukushima/09FY007/2009株は4薬剤(ペラミビル、ザナミビル、オセルタミビル、ラニナミビル)に対して、軽度のはずれ値を示した(各IC₅₀値:0.22nM、10.91nM、1.92nM、0.49nM)。A/Fukushima/09FY090/2009株は、オセルタミビ

ルに対して、軽度のはずれ値(3.78nM)を示した(表3)。

2010-2011 シーズンに NA 阻害試験で、はずれ値を示した A/H1N1pdm は 5 株であった。A/Hyogo/10K291/2011 株は、ペラミビル、オセルタミビルに対して高度のはずれ値を示し(各 IC₅₀ 値 : 37.09nM、443.95nM)、ラニナミビルに対してもわずかであるがはずれ値を示した(IC₅₀ 値 : 0.54nM)。また、A/Kyoto/10K124/2011 株もペラミビルとオセルタミビルに対して、高度のはずれ値を示した(各 IC₅₀ 値 : 24.85nM、309.79nM)。A/Kyoto/10K073/2011 株は 4 薬剤(ペラミビル、ザナミビル、オセルタミビル、ラニナミビル)に対して、軽度のはずれ値を示した(各 IC₅₀ 値 : 0.34nM、3.80nM、1.51n、0.66nM)。A/Nagasaki/10N073/2011 株はラニナミビルに対して、軽度のはずれ値を示した(0.53nM)。A/Kyoto/10K070/2011 はザナミビルに対して、軽度のはずれ値を示した(1.79nM)。

A/H3N2 ではずれ値を示したのは 2 株であった。A/Nagasaki/10N017/2011 株はオセルタミビルに対して、軽度のはずれ値を示した(2.12nM)。A/Niigata/10F010/2011 株はザナミビルに対して、軽度のはずれ値を示した(1.79nM)(表3)。B型に、はずれ値を示した株はなかった(表3)。

外れ値を示した株の NA 遺伝子シーケンスを行ったところ、2009/2010 年シーズンの H1N1pdm の A/Fukushima/09FY007/2009 株は、ウイルス分離株に I222T の NA アミノ酸変異があり、A/Fukushima/09FY090/2009 株は、M241I 変異があった(表4)。これらのアミノ酸変異はオリジナルの臨床検体にも認められた。A/Fukushima/09FY007/2009 株は I222T 変異が IC₅₀ 上昇に関与していると考えられた。

2010-2011 年シーズンにオセルタミビルとペラミビルに対して IC₅₀ が上昇していた A/Hyogo/10K291/2011 株は、ウイルス分離株と臨床検体にオセルタミビルにおける耐性変異として最も出現頻度が多い H274Y 変異が確認された。同じくオセルタミビルとペラミビルに耐性であった A/Kyoto/10K124/2011 株は、H274Y 変異が認められたほか、T384A 変異が確認された。A/Nagasaki/10N073/2011 株は、NA アミノ酸変異が確認されなかった。A/Kyoto/10K070/2011 は P120L、N221D 変異が認められた。なお、オリジナル臨床検体においても分離検体と同様の NA

変異が存在した。A/Kyoto/10K124/2011 は分離検体では S62X、V176G、R149X が確認されたが、オリジナル臨床検体では確認できず、代わりに T384A 変異がみられた。

なお、初診時にオセルタミビル/ペラミビル耐性で NA 遺伝子に H274Y 変異がみられた患者であるが、二人とも初診までに抗インフルエンザ剤の投与はなかった。一人はオセルタミビルで、もう一人はザナミビルで治療されていたが 2 日以内に解熱し経過の遷延はなかった。

2010-2011 年シーズン A/H3N2 の A/Nagasaki/10N017/2011 株はウイルス分離株のみ D151G 変異を確認した。A/Niigata/10F010/2011 株もまた、ウイルス分離株のみ I48T/I 変異が確認された(表4)。B型にははずれ値がなかったためシーケンスを実施しなかった。

D. 考察

2009-2010 年シーズンの薬剤耐性については、初診時に採取された新型インフルエンザから NA 遺伝子 H275Y 変異株はみつからなかった。検出方法としては、全ての検体に対してリアルタイム PCR を使って特異的に同部位の変異を検出しているのだからかなり正確な数字であり、少なくとも 2008-09 年にみられたようなオセルタミビル耐性株の大流行の兆しはない。2010 年より日本ではこれまでのオセルタミビル、ザナミビルの 2 剤に加えて、ペラミビル、ラニナビルが保険適応となり 4 剤がインフルエンザについて使用可能となった。定義したはずれ値以上の IC₅₀ 値を示したウイルス耐性株は、2009-2010 年シーズンに 2 株、2010-2011 年シーズンに 7 株確認された。2009-2010 年シーズンの A/Fukushima/09FY007/2009 株は、臨床検体のオリジナル株とウイルス分離株に確認された I222T のアミノ酸の変異が、NA 活性中心の枠組み部位の変異であるため、IC₅₀ 値が上昇したと考えられた。また、222 位では異なるアミノ酸変異 (I222M、I222V) による IC₅₀ 値の上昇が報告されている。A/Fukushima/09FY090/2009 株の臨床検体のオリジナル株とウイルス分離株に確認された M241I 変異は、新しい NA の変異だが、活性中心やその枠組み部位のアミノ酸から離れているので耐性を示す変異に関連づけることは出来なかった。2010-2011 年シーズンの

A/H1N1pdm ウイルスの A/Hyogo/10K291/2011 株は、ウイルス分離株とオリジナルの臨床検体にオセルタミビル耐性 H274Y 変異が確認された。このウイルス株はタミフルに対して、感受性株より数百倍も IC₅₀ 値が高かった。さらに、ペラミビルに対しても感受性株より IC₅₀ 値が数百倍高かった。一方、ラニナミビルに対してごく軽度のはずれ値を示したが、タミフルやペラミビルほど IC₅₀ 値の高度の上昇は見られず、ザナミビルに関しては、はずれ値を示さなかった。H274Y 変異があると、ペントキシル基がウイルス NA 疎水性ポケットへ結合することを妨げるため、薬剤が結合できない。このため、H274Y 変異をもつ株はペントキシル基をもつタミフルとペラミビルに対して耐性となり、IC₅₀ 値が上昇したと考えられた。ザナミビルとラニナミビルはペントキシル基をもたず、グアニジノ基により結合するので、このアミノ酸変異の影響を受けにくいと考えられた。A/Kyoto/10K124/2011 株も同様の結果をしめした。これらの二株は臨床的にはオセルタミビルもペラミビルも投与されていない患者からみつかっており、薬剤の投与による影響は考えられない。このためほかの患者からの伝播感染が疑われる。しかし、これまでのところ、耐性株の伝播効率が感受性株に比べて劣っているため、限定的な流行にとどまっていると考えられる。

最近の H274Y 変異 H1N1pdm に関する報告によると、アメリカの 2010-2011 シーズンにおける H274Y 変異の H1N1pdm の出現率は全体の 1% (35 検体/3,652 検体) であり、2009-2010 シーズンの 0.5% (37/6740) と大きな差はなかった。しかし、オセルタミビルの投与を受けていない伝播感染が疑われる例は 2009-2010 シーズンの 11.4% (4/35) と比較して 73.5% (25/34) と大幅に上昇した。(Emerg Inf Dis 2012) また、イギリスでも同様の報告があり、出現頻度は全体で 0.9%にとどまったが、伝播感染が疑われた件数は 2009-2010 シーズンの 9% (4/44) と比較して 42% (10/24) と大幅に上昇した。(Euro surveill 2011)。更に、2011 年夏には、オーストラリアにおける地域の伝播感染例が報告された。H274Y 変異 H1N1pdm 出現頻度は全体の 16% (29/182) に達し、伝播感染と思われる件数は 97% (28/29) に達した。またそれらのウイルスの HA、NA 遺伝子はほぼ一致しており、共通のウ

イルスから進化したものと考えられた。しかし、これらの耐性株は全てザナミビル感受性であった (NEJM 2011 Dec)

A/Kyoto/10K124/2011 株の臨床検体のオリジナル株のみ T384A の変異が確認された。NA の 384 位のアミノ酸変異は、NA 活性中心や枠組み部位のアミノ酸から離れた部位の変異であるため、IC₅₀ 値の上昇による変異と関連づけることは出来なかったが、耐性メカニズムに関しては何らかの役割を果たしている可能性があり興味深い。更なる分子疫学的研究による同アミノ酸変異の耐性ウイルスにおける優勢率及びリバースジェネティクスによる組み換えウイルス作製によるウイルス学的解析が期待される。A/Kyoto/10K073/2011 株の臨床検体とウイルス分離株とオリジナル株に確認された I240V、K372N 変異は、1 シーズン前の感受性 H1N1pdm に存在するシーズン特有のアミノ酸変異であり、薬剤に耐性を示す変異ではなかった。その他の V263I、F322L、I362V、N401K、S443I 変異は、NA の活性中心や枠組み部位のアミノ酸から離れた部位の変異であったため、蛋白構造予測解析からは直接的な関連は示唆されなかったが、耐性メカニズムに関与する可能性があるため、今後の検討を要する。A/Kyoto/10K070/2011 株の臨床検体のオリジナル株とウイルス分離株に確認された P120L、N221D 変異は、文献的な報告はないが、それぞれ I122、I222 の活性中心の枠組み部分のアミノ酸近傍の変異のため IC₅₀ 値が上昇に繋がった可能性があると考えられた。

2010-2011 年シーズン A/H3N2 の A/Nagasaki/10N017/2011 の分離株に確認された D151G 変異は、NA 活性中心のアミノ酸変異のためオセルタミビルの IC₅₀ 値の上昇につながったと考えられた。しかし、D151G 変異が確認されたのは分離株のみで、オリジナル臨床検体からは確認されなかった。従って、この D151G 変異はウイルス培養によって出現した変異であり、実際に患者体内で増殖していたウイルスとは異なり、臨床的には重要ではないと考えられる。A/H3N2 については、以前と同様にアマンタジン耐性であることが遺伝子変異より確認されているため引き続きアマンタジンの投与は避けたほうがよいと思われる。