

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Dynamics of Influenza Virus in Patients
和訳 インフルエンザ患者におけるウイルス動態の分子生物学的解析
指導教官 木村 哲 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 11 年 4 月 1 日入学
医学博士課程
内科学専攻
氏名 白石 京子

インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)に属するマイナス鎖 RNA ウイルスであり、A 型、B 型、C 型に分類される。臨床的に重要なのは、A 型および B 型インフルエンザウイルスで、それぞれ 8 本の一本鎖 RNA を持つ。感染防御に重要なインフルエンザウイルスの抗原性は、主として、その第 4 分節と第 6 分節にコードされている 2 つの表面蛋白質である赤血球凝集素(HA; hemagglutinin)とノイラミニダーゼ(NA; neuraminidase)により決定される。インフルエンザウイルスは、その抗原性が容易に変化することから、宿主の免疫より巧みに逃れ、流行を続け、人類に多大な被害を与えている。

A 型インフルエンザウイルスは、水鳥からヒトまで幅広い宿主を持つ。2 種類の異なるウイルスが同時に一つの細胞に感染すると様々な組み合わせの遺伝子を持つ遺伝子再集合体(reassortment)ができる。トリとヒトのウイルス間でできた遺伝子再集合体の中には、その抗原性がこれまで人類で流行していたものとは大きく異なるものがあり、こうして出現した新種のウイルスは、大流行(pandemic)を起こす。人類は、20 世紀に 3 度の pandemic を経験した。すなわち、1918 年の H1N1 ウイルスによるスペイン風邪、1957 年の H2N2 ウイルスによるアジア風邪、1968 年の H3N2 ウイルスによる香港風邪である。一方、B 型インフルエンザウイルスは、宿主が限られているため、こうした pandemic は起こさないが、地域的な流行(epidemic)を引き起こし、インフルエンザによる死亡の原因となる。

A 型および B 型インフルエンザウイルス感染症は、呼吸器症状の他にも筋炎、

心筋炎、脳症などの様々な合併症を引き起こし、小児や老人では死亡の原因となる。中でもインフルエンザ脳症は、多くの小児で発症し、致死率が高く、重度の後遺症を残す合併症として大きな問題となっているが、原因は未だに不明である。

こうした、インフルエンザに対して我が国では、1998年よりアマンタジンによる治療が可能となり、その使用が急速に広まった。アマンタジンは、我が国ではパーキンソン病治療薬として長く使われてきたが、抗インフルエンザ薬としての使用が開始されると、抗生物質に対する耐性菌の問題と同様、アマンタジンに対する耐性ウイルスの問題が出現してきた。

本論文では、これらインフルエンザ感染症について問題となっている2つのテーマ、すなわちインフルエンザ脳症（第1章）とアマンタジン耐性ウイルス（第2章）について分子生物学的解析を行った。

第1章：B型インフルエンザ脳症原因ウイルスの分子生物学的解析

インフルエンザ脳症は発熱などのインフルエンザ症状とともに、痙攣、意識障害が急速にすすむ疾患で、我が国では毎年100人以上の小児が亡くなっている。国際的には、まだ独立した疾患としての認知を受けていないが、インフルエンザ発症後に同じく中枢神経症状を呈するReye症候群とは、臨床経過が異なり、我が国では独立した疾患として取り扱っている。

本研究では、1998/1999シーズンにインフルエンザ脳症患者から分離された、B型インフルエンザウイルス(SAG99)からRNAを抽出し、RT-PCR法にてcDNAを増幅後、ダイレクトシーケンス法によりHA, NA, NP, M, NS遺伝子の塩基配列を調べた。同シーズンに非脳症患者から分離された一般流行ウイルスについても同様にして塩基配列を決定し、SAG99との相同性を調べるとともに系統発生的解析を行った。HAとNAについては、以前報告された2例のB型インフルエンザ脳症原因ウイルスとSAG99との比較も行った。

その結果、SAG99は、いずれの遺伝子も同シーズンの一般流行ウイルスと高い相同性を示し系統樹上でも同じクラスターに属していた。また、HA, NAについては、他の2例の脳症原因ウイルスとの比較も行ったが、これら3例の脳症原因ウイルス間に共通のアミノ酸変異は認められなかった。

これらの結果より、インフルエンザ脳症は、一般流行ウイルスにより発症しうると考えられた。インフルエンザ脳症については未だ原因は不明であるが、ウイルスそのものよりも、むしろ、他の要因（サイトカイン、薬、他のウイルスなど）によるとする説が現在有力であり、本研究の結果もそれを支持するものであった。

第 2 章：小児におけるアマンタジン耐性ウイルスの出現頻度と経時的出現パターン

抗インフルエンザ薬アマンタジンは、A 型インフルエンザウイルスの M2 蛋白質のイオンチャンネル活性を阻害することにより、その増殖を抑制する。これまで、その耐性ウイルスは、治療患者の約 30%に出現するとされていたが、多くの報告は、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定しているため、耐性ウイルスが、野外株中に混在していても大勢を占めない限り見逃されていた可能性があった。

本研究では、17 人のアマンタジン治療患者より分離されたウイルスから RNA を抽出し、RT-PCR 法により増幅した M 遺伝子をプラスミドにクローニングした後に塩基配列を決定した。この方法により、耐性ウイルスと感受性ウイルスの相対比の同定とともに少数混在する耐性ウイルスの検出も可能となった。また、耐性ウイルスの出現パターンを明らかにするために、同一患者で経時的にサンプルを採取し解析を行った。

その結果、治療前に薬剤感受性を示した 15 例のうち、12 例（80%）で治療開始後に耐性ウイルスの出現が認められた。2 例の患者では、治療前から薬剤耐性を示したが、アマンタジン治療患者との接触歴ははっきりしなかった。現在まで、臨床検体での耐性変異は 5 種類報告されているが、そのすべてが今回の研究で認められており、しかも多くの患者では複数の耐性変異株が同時に出現、共存し続けていることが明らかになった。経時的にサンプルの解析を行った 6 人の患者のうち、2 人でアマンタジン治療開始後に耐性ウイルスが一度優勢になった後、治療を終了すると、再び感受性ウイルスが優勢になる例が認められた。この結果は、アマンタジン非存在下では、アマンタジン感受性ウイルスの方が耐性ウイルスよりも、よく増殖する可能性を示唆している。

今回の解析方法によりアマンタジン耐性ウイルスが、従来の報告よりはるかに高頻度に出現すること、また、同一患者で複数の耐性ウイルス出現が頻繁に起こっていることが明らかになった。

これら 2 つの研究は、インフルエンザ感染症の管理をすすめる上で、重要な情報を提供するものと考えられる。重篤な合併症である脳症が一般の流行ウイルスにより発症しうることが示唆されたが、このような合併症による死亡、後遺症を防ぐためには、インフルエンザウイルスの感染予防と重症化を防ぐことが必要であると考えられる。感染予防については、ワクチンが有効であるが、現行の不活化ワクチンの効果には限界があり、より有効で安全なワクチンの開発が必要である。また、重症化を防ぐためには、適切な治療が必要であるが、その手段として我々は 2 種類の抗インフルエンザ薬—アマンタジンとノイラミニダーゼ阻害薬—を持っている。これらの薬は、作用機序が全く異なり上手に使い分ける、もしくは、併用することにより耐性ウイルスの増加を防いでいくことが重要であると考えられる。