

[論文の内容の要旨]

Dynamics of antiviral-resistant influenza virus

薬剤耐性インフルエンザウイルスの分子生物学的解析

指導教員： 河岡義裕 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学 専攻

氏名： 木曾 真紀

インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae) に属すマイナス鎖 RNA ウイルスで、核蛋白質 (NP) と膜蛋白質 (M1) の抗原性の違いから、A、B、C 型に分類される。このうち、A 型と B 型が主に人の感染症として重要である。A 型、B 型ともにウイルス RNA は 8 つの分節に分かれている (図 1)。ウイルス粒子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) は第 4 および第 6 分節にコードされるが、この 2 つの表面蛋白質がインフルエンザウイルスの抗原性に重要である。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、宿主の免疫から逃れ、常に新たな流行を引き起こしている。ワクチンによる予防も、この抗原性の違いによっては効果が減ずる場合がある。

インフルエンザウイルスはウイルス粒子上の赤血球凝集素 (HA) が細胞表面のシアル酸に結合することにより細胞内に侵入する。一方、子孫ウイルスが細胞外に放出される際には、ノイラミニダーゼが、ウイルスの HA と NA ならびに

細胞表面の糖蛋白質や糖脂質からシアル酸を除くことにより、細胞表面からのウイルスの遊離を促進する。遊離したウイルスは、新たな細胞に感染し、感染が拡大する。このように、HAによるレセプターへの結合とNAによるレセプターからの遊離という両者の働きが、ウイルス増殖に重要な役割を示す。A型インフルエンザにしか存在しないM2蛋白質は、97アミノ酸からなる膜貫通蛋白質で、酸性条件下で活性化され水素イオンをウイルス粒子内に取り込むイオンチャンネル活性を持つ。その働きにより、ウイルス粒子内が酸性化され、RNP（RNAと核蛋白質の複合体）と内部蛋白質との結合がほぐれ、RNPが細胞質へ放出され、ウイルスの感染が進行する。このようなウイルスの感染様式に基づき、抗インフルエンザ薬の開発が行われてきた。

抗インフルエンザ薬として最初に登場したM2阻害剤（アマンタジン、リマンタジン）はA型インフルエンザウイルスのみに効果がある。アマンタジンは従来パーキンソン病の治療に使用されてきた。本邦では1998年よりA型インフルエンザ治療に対する使用が可能となった。アマンタジンは感染初期に投与すれば極めて有効な治療薬だが、B型には効果がなく、副作用や耐性ウイルスの出現が問題である。M2阻害剤耐性ウイルスは、早い場合は治療後1日で出現し、その病原性は親株に劣らず、ヒトからヒトへと伝播する。近年では、野外に存在するH3N2ウイルスの90%がすでにアマンタジン耐性を獲得しているという報告もある。また、アジアを中心に猛威を奮うH5N1ウイルスの一部もアマンタジン耐性である。

このような背景から、ノイラミニダーゼ阻害剤が注目されている。ノイラミニダーゼ阻害剤はインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼの3次元構造を基に開発された。本剤は、NAの活性部位に結合し、酵素活性を阻害することによりウイルスの感染細胞からの遊離を阻止する。NAの活性部位はインフルエンザウイルスの型、亜型間で保存され、そのため抗インフルエンザウイルス

薬のターゲットとなった。本剤はインフルエンザウイルスのみに特異的な効果を示す。M2 阻害剤と異なり、副作用は少なく、B 型インフルエンザウイルスにも効果があり、*vitro* の試験や臨床試験の段階から、耐性ウイルスが出現しにくいということは報告されていた。本邦では 2001 年より吸入薬のザナミビル、経口薬のオセルタミビルが使用可能となった。本邦における NA 阻害剤の使用量は、世界の 7 割近くに及ぶ。

本研究では、この新たに登場したインフルエンザの特効薬であるノイラミニダーゼ阻害剤のうち、オセルタミビルについて、未だ未解明であった、臨床現場における耐性ウイルスの出現状況（第 1 章）と、近年、アジア、ヨーロッパ、ならびにアフリカで猛威を奮っている H5N1 インフルエンザウイルス感染者から検出された、オセルタミビル耐性ウイルス（第 2 章）について、分子生物学的解析を行った。

第 1 章 小児におけるオセルタミビル耐性 A 型インフルエンザウイルス

オセルタミビルは、インフルエンザウイルスに非常に有効なノイラミニダーゼ阻害薬であり、ウイルスのノイラミニダーゼ活性を阻害する。オセルタミビルは、アマンタジンやリマンタジンよりも耐性ウイルスの出現頻度が低いとされているが、オセルタミビル投与患者における本剤耐性ウイルスの出現については限られた情報しか得られていない。本研究では、インフルエンザ治療を受けた小児を対象としてオセルタミビル耐性株の出現を検討した。

小児 50 名からオセルタミビル投与前および投与後に検体を採取し、A 型インフルエンザウイルス (H3N2) を分離し、解析した。分離したウイルス遺伝子のノイラミニダーゼおよびヘマグルチニンの塩基配列を決定し、ノイラミニダーゼ変異を示したウイルスについて、オセルタミビル活性体であるカルボン酸オセルタミビルに対する感受性を検討した。

その結果、オセルタミビル投与を受けた9名（18%）の患者から分離されたウイルスのノイラミニダーゼに変異が検出された。そのうち6名では、292番目のアミノ酸(Arg292Lys)に、2名では119番目のアミノ酸(Glu119Val)に変異が認められた。これらはいずれもノイラミニダーゼ阻害薬に対する耐性を付与する変異であることが既にわかっている。1名では、別の変異(Asn294Ser)が認められた。カルボン酸オセルタミビルに対する感受性を調べたところ、Arg292Lys、Glu119Val、Asn294Ser の変異を有するノイラミニダーゼは、薬剤投与前のノイラミニダーゼと比較して、それぞれ約 $10^4 \sim 10^5$ 倍、500倍、300倍耐性になっていた。オセルタミビル耐性ウイルスは、治療4日目の検体にはじめて検出され、それ以降、各日の調査検体からも引き続き検出された。薬剤耐性ウイルスが出現しなかった患者でも、その一部では、治療開始後5日目であっても1mlあたり 10^3 感染価以上のウイルスが検出された。

以上、オセルタミビルを投与された小児インフルエンザ患者における本剤耐性ウイルスの出現頻度は、過去の報告を上回っていた。また、オセルタミビル投与開始後5日目であっても、小児は相当量のウイルスを排出していることが明らかとなった。

第2章 ベトナムにおけるオセルタミビル耐性 H5N1 インフルエンザウイルスの出現

アジアに始まり、ヨーロッパそしてアフリカに伝播した H5N1 鳥インフルエンザにより多くの方が死亡しており、世界的なインフルエンザの流行（パンデミック）が危惧されている。しかしながらパンデミックに備えて十分量のワクチンを備蓄することは非常に困難である。従って、H5N1 ウイルスによるパンデミックが生じた場合、当面は抗ウイルス薬による防御が最も有効である。しかし、現在流行している H5N1 インフルエンザウイルスの一部は、既に M2 阻

害剤(アマンタジンなど)に対し耐性を獲得している。従って、ノイラミニダーゼ阻害剤であるザナミビルあるいはオセルタミビルに頼るしかない。薬剤の使用には、常に耐性の問題がつきまとうが、ノイラミニダーゼ阻害剤による H5N1 ウイルス治療により、如何なる薬剤耐性ウイルスが出現するのかはほとんどわかっていない。

本研究では、H5N1 インフルエンザに感染した兄を看病している間に、H5N1 ウイルスに感染した 14 歳のベトナムの少女から分離されたウイルスの性状を解析した。少女は予防的に 3 日間オセルタミビルを治療量の半量服用していた。ノイラミニダーゼ遺伝子の塩基配列解析から、274 番目のアミノ酸に変異を検出した。この変異はオセルタミビル耐性を付与することがわかっている。検出された変異ウイルスおよびその親株（オセルタミビル感受性ウイルス）を用いて、フェレットでの感染実験を行った。オセルタミビル耐性ウイルスは親株と比較しその増殖性は低下していた。また、ザナミビルはオセルタミビル感受性ウイルスのみならずオセルタミビル耐性ウイルスに対しても有効であった。このフェレットでの成績は、*in vitro* のノイラミニダーゼ阻害試験の結果と一致していた。

以上の結果から、H5N1 ウイルスにおいてもオセルタミビル耐性ウイルスが出現することが判明したが、ザナミビルによる治療が可能であることが判明した。

以上、第 1 章では、小児におけるオセルタミビル耐性ウイルスが予想以上に高頻度に出現していることを明らかにした。調べた小児はインフルエンザウイルスに初めて感染した可能性が高く、本ウイルスに対し基礎免疫を保有しておらず、ウイルス排除能が劣っているため、ウイルスが増殖しやすく耐性ウイルスが出現しやすい可能性が考えられる。第 2 章では、H5N1 ウイルスという、人類にとって未知のウイルスもオセルタミビル耐性になることを明らかにした。

本ウイルスに対して人々は感染したことがないため、ウイルス排除はままならず、耐性ウイルスが出現しやすいと考えられる。H5N1 ウイルスのみならず他の鳥インフルエンザウイルスに対しても誰もが初感染であるため、ウイルスが体内で増殖しやすく薬剤耐性ウイルスが容易に出現することが予想される。従って、抗インフルエンザ薬は、特定のものに限定せず、幅広く備蓄する必要があると考えられる。