

## [ノート]

## 兵庫県における 2009/10 シーズンのインフルエンザウイルスの性状解析

押部 智宏<sup>1\*</sup> 齋藤 悦子<sup>1</sup> 榎本 美貴<sup>1</sup> 高井 伝仕<sup>1</sup> 山口 幹子<sup>2</sup>  
辻 英高<sup>1</sup> 山本 昭夫<sup>1</sup> 岡藤 輝夫<sup>3</sup> 飯尾 潤<sup>4</sup> 近平 雅嗣<sup>1</sup>

Characteristic Analysis of the Epidemic Influenza Viruses in Hyogo  
Prefecture, Japan, during 2009/10 Season.

Tomohiro OSHIBE<sup>1\*</sup>, Etsuko SAITO<sup>1</sup>, Miki ENOMOTO<sup>1</sup>, Denshi TAKAI<sup>1</sup>, Mikiko YAMAGUCHI<sup>2</sup>,  
Hidetaka TSUJI<sup>1</sup>, Akio YAMAMOTO<sup>1</sup>, Teruo OKAFUJI<sup>3</sup>, Jyun IIO<sup>4</sup> and Masatsugu CHIKAHIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*, <sup>2</sup> *Sumoto Public Health and welfare center*, <sup>3</sup> *Okafuji Pediatric Clinic* and <sup>4</sup> *Hyogo Prefectural Tsukaguchi Hospital*

In 2009/10 season (May-March) Pandemic A(H1N1) 2009 (AH1pdm) mainly predominated in Hyogo prefecture. The pattern of epidemic in this season was different from that of most regular flu seasons. The epidemic in this season began in mid-August and the flu activity peaked in late October. This flu season was earlier and the term of epidemic was longer than regular flu seasons.

Total 761 cases were detected by RT-PCR or isolation through this season. Ninety-seven percent (97%) of influenza viruses detected was AH1pdm. The seasonal AH3 was 2.6%, AH1 was 0.4%. Influenza B was not detected.

AH1pdm isolates were all antigenetically similar to A/California/7/2009 (H1N1) pdm strain (2009/10 vaccine strain). AH1 isolates were antigenetically similar to A/Brisbane/59/2007 strain (2009/10 vaccine strain). 69% of AH3 isolates showed reduced HI titers with A/Uruguay/716/2007 (H3N2) strain (2009/10 vaccine strain).

Influenza virus isolates in Hyogo prefecture have been screened for the oseltamivir-resistance by analyzing neuraminidase H275Y mutation by using nucleotide sequencing. One of 96 AH1pdm isolates was tested positive for oseltamivir resistance.

## I はじめに

インフルエンザは、冬季に幼児や児童を中心に流行し、罹患しても通常1週間程度で軽快するが、高齢者や基礎

疾患があると肺炎等を併発して重症化して死に至ることがある。

2009年3月にメキシコで発生した Pandemic A (H1N1) 2009 (以下 AH1pdm) は、世界各地へと急速に感染が拡大し、2009/10 シーズン初期の5月16日(第20週)には神戸市で最初の国内患者の発症例が確認され、県内でも多数の患者が発生した。

AH1pdm ウイルスはヒトに感染する前はブタで流行していたウイルスとされているが、遺伝学的には鳥、ブタ、ヒトに由来するウイルスの遺伝子分節で構成されて

<sup>1</sup>感染症部 <sup>2</sup>洲本健康福祉事務所 <sup>3</sup>岡藤小児科医院

<sup>4</sup>兵庫県立塚口病院

\*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29  
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター  
感染症部 押部 智宏

おり、これらのウイルスが過去に様々な遺伝子交雑を繰り返して出現したと推定されている<sup>1)</sup>。

過去に甚大な健康被害をもたらしたスペイン風邪等の経験から、AH1pdm ウイルスが今後どのように変化していくか、特に病原性、薬剤耐性等の性状変化への監視が重要となっている。

当研究センターでは従来から感染症発生動向調査によってインフルエンザの流行状況を調べており、これらの取り組みの一環として県内の患者からインフルエンザウイルスを検出すると共に、これらについて型（亜型）同定、ウイルス遺伝子の解析、薬剤耐性マーカーの検索を行ったので報告する。

## II 材料と方法

### 1. インフルエンザウイルス検体

2009 年第 20 週（5 月 11 日～17 日）から 2010 年第 12 週（3 月 22 日～28 日）までに、県健康福祉事務所および西宮市保健所から搬入された咽頭または鼻腔ぬぐい液 629 検体、病原体定点医療機関で採取された 388 検体の合計 1,017 検体を供試した。

### 2. インフルエンザウイルスの遺伝学的同定

AH1pdm, A ソ連型（以下 AH1 型）、A 香港型（以下 AH3 型）の同定は、病原体検出マニュアル「H1N1 新型インフルエンザ」（国立感染症研究所）に準じて Real-Time RT-PCR 法および RT-PCR 法により行った。

### 3. インフルエンザウイルスの分離

採取した咽頭ぬぐい液を MDCK 細胞に接種し、トリプシン存在下で 5%CO<sub>2</sub> の条件で 33°C、7 日間培養し、2 代盲継代した<sup>2)</sup>。細胞変性効果のみられた培養上清は、0.75%モルモット赤血球あるいは 0.5%七面鳥赤血球を用いて赤血球凝集（HA）試験を行った<sup>3,4)</sup>。

### 4. インフルエンザウイルス株の同定及び抗原解析

ウイルスの AH1, AH3 および B 型別及び抗原解析は、赤血球凝集抑制（HI）試験法を用いた<sup>3,4)</sup>。標準抗血清は国立感染症研究所より分与された感染フェレット抗血清 A/California/7/2009 (H1N1) pdm, A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Uruguay/716/2007 (H3N2) を使用した。

### 5. インフルエンザウイルス遺伝子の解析

2009 年 5 月から 2010 年 6 月までに分離されたウイルス株 36 株について RT-PCR 法により HA 遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列（1,701 塩

基）を決定し、Neighbor-Joining 法により系統樹解析を行った。

### 6. 抗インフルエンザウイルス薬剤耐性マーカーの検索

オセルタミビル耐性の指標となる NA 蛋白の 275 番目のアミノ酸のヒスチジンからチロシンへの置換（H275Y）について、RT-PCR 法で増幅した DNA をダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定して変異の有無を検索した。

## III 結果と考察

### 1. インフルエンザの流行状況およびウイルス検出状況

2009/10 シーズンの当研究センターにおける、週別のインフルエンザウイルスの検出状況および一定点当たりの患者数を Fig.1 に示した。

2009 年第 20 週（5 月 11 日～17 日）の AH1pdm の国内発生以降、夏季にかけても感染は終息せず県内の患者から継続的に AH1pdm が検出された。例年この時期はインフルエンザ患者の発生報告もまれでウイルスも検出されることがなく、今シーズンは特異な流行パターンとなった。

感染症発生動向調査によると、県内のインフルエンザ定点医療機関の 1 定点当たりの患者数<sup>5)</sup>は、2009 年第 33 週（8 月 10 日～8 月 16 日）に流行開始の指標となる 1.0 人を超え、2009 年第 44 週（10 月 26 日～11 月 1 日）の 42.55 人がピークとなった。

一方、全国の調査では、1 定点当たりの患者数が 1.0 を初めて超えた週は本県と同じく第 33 週であり、その後のピークは第 48 週（11 月 23 日～11 月 29 日）の 39.7 人<sup>6)</sup>で本県の方が約 1 ヶ月早かった。流行のピークは例年 1 月から 2 月にかけて見られるが、今シーズンの本県のピークは約 3～4 ヶ月早かった。第 44 週以降は、緩やかに患者数が減少し 2010 年第 8 週に 1.0 人を下回り流行が終息した。全国の調査では 1.0 を下回った週は本県よりも 1 週遅い第 9 週となった<sup>6)</sup>。

また、1 定点当たりの患者数が 1.0 人を超えた週数（流行期間）は、通常 13～19 週間、最長 25 週間（2008/09 シーズン）である<sup>6)</sup>が、今シーズンはこれを大きく上回る 28 週間で例年に比べ長期間流行が続いた。

当研究センターに搬入された 1,017 検体のうち 761 検体（74.8%）がインフルエンザ陽性となり、このうち AH1pdm が 738 検体（97.0%）、AH1 型が 3 検体（0.4%）、AH3 型が 20 検体（2.6%）であった。

週別の検出状況を見ると、本流行シーズンの最初に検出された 2009 年第 20 週から最後に検出された 2010 年

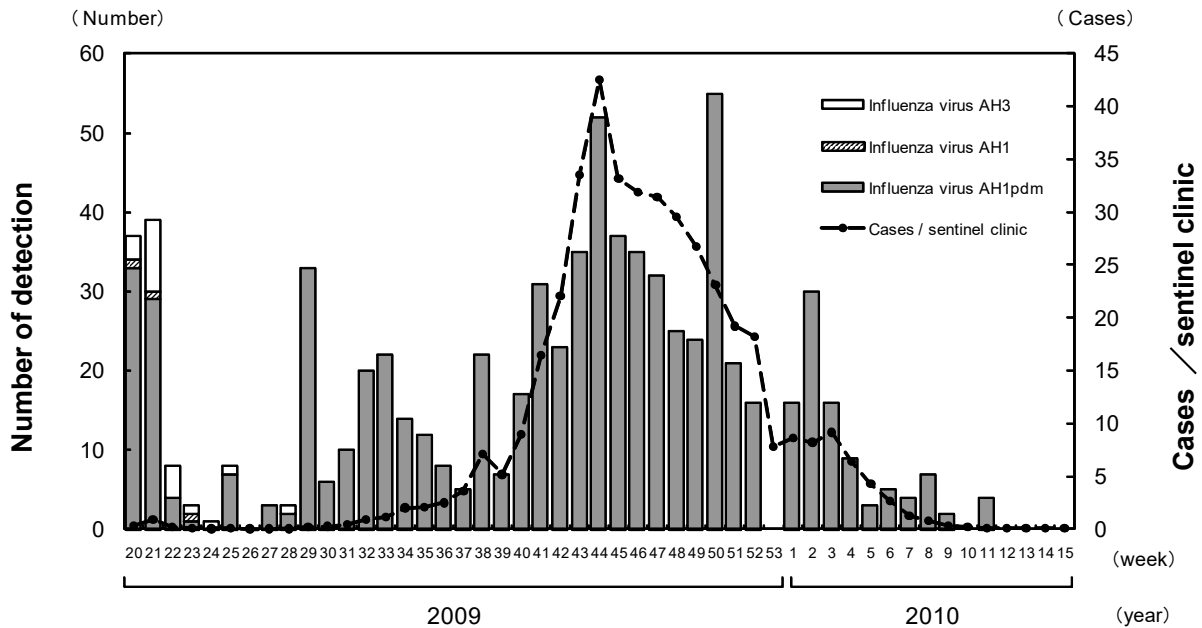


Fig.1 Weekly transition of the patient's number and detection of influenza viruses in Hyogo prefecture during the 2009/10 season

第11週(3月15日～3月21日)まで第24, 26, 53週を除き、全ての週でAH1pdmが検出された。検出数が最も多かったのは第50週(12月7日～12月13日)の55検体で、次いで流行のピークとなった第44週(10月26日～11月1日)の52検体であった。

一方、季節性インフルエンザのAH1型は第23週(6月1日～6月7日)、AH3型は第28週(7月6日～7月12日)まで検出され、それ以降は検出されなかった。県内のインフルエンザ定点の1定点当たりの患者数が1.0人を超えた流行期間は、AH1pdm以外検出されず、この期間の流行の主体はAH1pdmであった(Fig.1)。

例年A型の流行期に検出されているB型は、今シーズンは検出されなかった。

2. 県内分離株の抗原解析

2009/10シーズンに県内で分離されたインフルエンザウイルス株の抗原解析の結果をTable 1に示した。

分離されたAH1pdmの446株について、ワクチン株A/California/7/2009(H1N1)pdmの抗血清を用いてHI試験を行った。その結果、この抗血清とワクチン株間のHI価(ホモHI価)との差が全て2倍以内に収まっており、抗原性が異なると解釈される8倍以上の変異株はなかった。これらの結果から県内のAH1型の流行株の多くはA/California/7/2009(H1N1)pdm類似株と考えられた。

国立感染症研究所が行った全国調査でも、629株中8

Table 1 Hemagglutination inhibition tests of isolates to the reference antisera

	Fold difference in HI titers against the reference antisera*			Total
	≤2-fold	4-fold	≥8-fold	
AH1pdm	446			446
AH1	1	1		2
AH3		5	11	16

\* The reference antisera is Anti-A/California/7/2009 (H1N1) pdm, Anti-A/Brisbane/59/2007 (H1N1), Anti-A/Uruguay/716/2007 (H3N2) ferret serum

倍以上の抗原性の異なる株は3株のみで、大多数はワクチン株と抗原性が類似していることが報告されており<sup>6)</sup>、県内の分離株と同様であった。

AH1型のワクチン株であるA/Brisbane/59/2007(H1N1)の抗血清によるHI試験では、ホモHI価との差が2倍以内であった株が2株中1株で、4倍が1株であり、ワクチン類似株であった。

AH3型のワクチン株であるA/Uruguay/716/2007(H3N2)の抗血清によるHI試験では、ホモHI価との差が4倍であった株が16株中5株で、8倍以上を示した抗原変異株は11株(69%)であった。全国の結果では、2009年3月～8月に分離された株は抗原変異株が75%を占め、今後の流行はA/Perth/16/2009(H3N2)類似株へと移行していく傾向がみられたことが報告されており<sup>6)</sup>、今回の結果と同様であった。

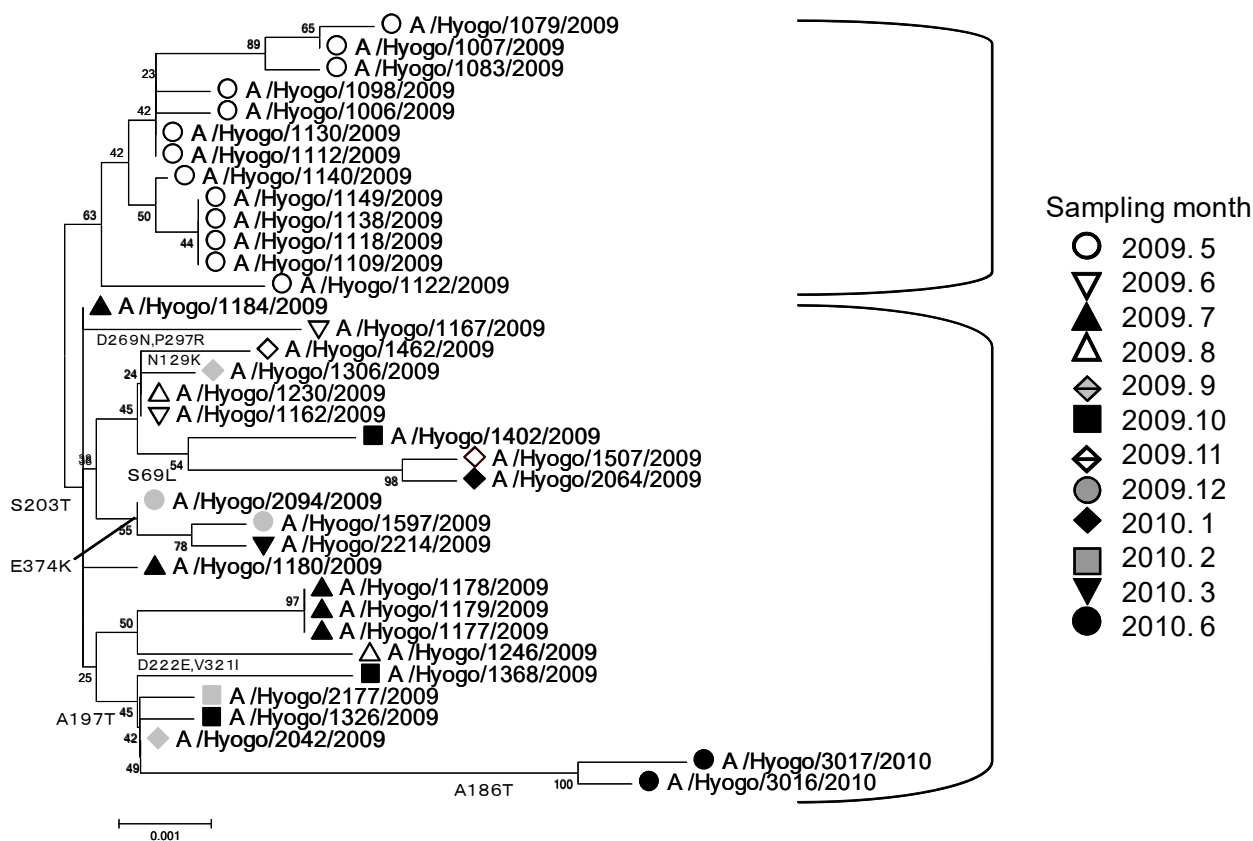


Fig.2 Phylogenetic analysis of influenza AH1pdm HA genes in Hyogo prefecture

Table 2 Detection of antiviral resistance marker on samples collected during 2009/ 10 season

Type	Oseltamivir (NA gene:H275Y)	
	Samples tested (n)	Antiviral Resistance Marker,Number (%)
Seasonal Influenza A (AH1)	2	2 (100%)
Influenza A (AH1pdm)	96	1 (1%)

### 3. 県内の AH1pdm ウイルス株の遺伝子解析

県内で分離された 36 株の HA 遺伝子の系統樹解析結果を Fig.2 に示した。

2009 年 6 月以降の分離株は、すべてが 203 番目のアミノ酸置換 (S203T) を持つグループに属し、5 月の初発の流行株とは異なるグループに分類された。2009 年 6 月以降の流行株は、D269N および P297R 置換を持つ 1 株、N129K 置換の 1 株、S69L 置換の 3 株、E374K 置換を持つ 3 株、A197T 置換を持つ 6 株が存在した。A197T 置換株は、さらに D222E、V321I 置換株 1 株と A186T 置換株 2 株があった。

今回の解析で HA 蛋白の抗原性に関与するとされる領域に変異がみられた A197T、D222E、A186T 置換株について HI 試験による抗原解析を行った結果、ホモ HI 価との差はいずれも 2 倍以内であり抗原性に大きな変化は見られなかった。

### 4. 抗インフルエンザウイルス薬剤耐性マーカーの検索

県内分離株における抗インフルエンザウイルス薬剤耐性マーカーの検索結果を Table 2 に示した。

オセルタミビル耐性については、解析した AH1 型の 2 株すべてに耐性マーカーである NA 遺伝子の H275Y のアミノ酸置換がみられた。全国の検出状況では、2008/09 シーズンに分離された AH1 型のオセルタミビル耐性株は、1,482 株中 1,477 株 (9.7%) であったことが報告され<sup>7)</sup>、本県でも解析した 16 株すべてが耐性株であったことから<sup>8)</sup>、県内で薬剤耐性を保持した株が今シーズンも分離されたことが分かった。

一方、AH1pdm は解析した 96 株中 1 株 (1%) で H275Y 置換が見られた。この株について国立感染症研究所が行った薬剤感受性試験結果では、オセルタミビルに対する 50%NA 活性阻害濃度 (IC50) は 28.76nM、ザナミビルは 0.46nM であり、オセルタミビルに対して耐性である

ものの、ザナミビルに感受性を示した。

全国では、2009/10 シーズンの AH1pdm の 6,738 株の調査により 65 株の耐性株が検出され、検出率は 1.0% であったと報告されており<sup>6)</sup>、県内の検出率と同程度であることが分かった。

#### IV 要 旨

兵庫県における 2009/10 シーズンのインフルエンザは、シーズンを通して AH1pdm ウイルスによる大規模な流行が見られた。流行パターンは例年と比較して大きく異なり、2009 年第 33 週（8 月 10 日～8 月 16 日）に流行開始の指標となる 1 定点当たりの患者数が 1.0 人を超え、第 44 週（10 月 26 日～11 月 1 日）にピークとなった。その後、緩やかに減少して 2010 年第 8 週に 1.0 人を下回った。

今シーズン（2009 年 5 月～2010 年 3 月）の総検出数 761 検体における検出比は、AH1pdm が 97.0%、AH1 型が 0.4%、AH3 型が 2.6% であり、B 型は検出されなかった。

季節性の AH1 型、AH3 型が検出されたのはシーズン初期の 2009 年第 28 週までであり、それ以降は全て AH1pdm のみが検出され、流行の主体は AH1pdm であることが分かった。

HI 試験による抗原解析の結果、AH1pdm は解析した 446 株すべてがワクチン株である A/California/7/2009 (H1N1) pdm 類似株であった。また、AH1 型の 2 株もワクチン株である A/Brisbane/59/2007 (H1N1) の類似株であった。AH3 型は解析した 16 株のうち 11 株（69%）がワクチン株の A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) の抗原変異株であった。

AH1pdm ウイルス株の薬剤耐性マーカーを検索した

結果、96 株中 1 株（1%）に耐性株が検出されたが、耐性株の地域流行はみられなかった。

#### 文 献

- 1) Smith, G. J., Vijaykrishna, D. and Bahl, J.: Origin and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* **459**, 1122-1125 (2009)
- 2) 山岡政興, 押部智宏, 稲元哲朗: A 香港型インフルエンザウイルスのキモトリプシン存在下での MDCK 細胞による分離について. 兵庫県立健康環境科学研究センター紀要, **4**, 54-57 (2007)
- 3) 根路銘国昭, 杉浦昭, 植田昌宏: オルソミクソウイルス. ウイルス実験学各論, 改訂二版, 国立予防衛生研究所学友会編, 287~330 (1982)
- 4) 根路銘国昭: インフルエンザウイルス, 微生物検査必携, ウイルス・クラミジア・リケッチア検査, 第 II 分冊, 各論 1, 厚生省監修, 第 3 版, 2-24, 日本公衆衛生協会 (2004)
- 5) 兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター: 兵庫県感染症発生動向調査事業年報, 平成 21 年版 (2011)
- 6) IASR 病原微生物検出情報 (月報), **31**, 第 9 号, 248-264 (2010)
- 7) IASR 病原微生物検出情報 (月報), **30**, 第 11 号, 285-286 (2009)
- 8) 押部智宏, 齋藤悦子, 榎本美貴, 高井伝仕ほか: 兵庫県における 2008/09 シーズンのインフルエンザウイルス分離株の性状解析. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, **1**, 1-4 (2010)