

[ノート]

兵庫県における 2010/11 シーズンのインフルエンザウイルス株の性状解析

押部 智宏¹ 榎本 美貴¹ 高井 伝仕¹ 岡藤 輝夫² 飯尾 潤³ 近平 雅嗣¹

Characteristic Analysis of the Circulating Influenza Viruses in Hyogo Prefecture, Japan, during 2010/11 Season

Tomohiro OSHIBE¹, Miki ENOMOTO¹, Densi TAKAI¹, Teruo OKAFUJI², Jun IIO³
and Masatsugu CHIKAHIRA¹*¹Infectious 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, ²Okafuji Pediatric Clinic and ³Hyogo Prefectural Tsukaguchi Hospital*

During the 2010/11 influenza season, the epidemic caused by influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and influenza B virus was observed in Hyogo prefecture, Japan. According to the data of Hyogo Infectious Diseases Weekly Report obtained from 199 sentinel clinics, the epidemic pattern showed trimodal with peaks in 4th week, 11th week and 16th week of 2011. From the result of detection of influenza virus, it was considered that the first large peak in 4th week was mainly predominated by A(H1N1)pdm09, followed by the second peak in 11th week by A(H3N2) and the third peak was influenza B virus. All of 101 A(H1N1)pdm09 isolates were antigenetically related to A/California/07/2009 (2010/11 influenza vaccine strain). All of 76 A(H3N2) isolates were antigenetically related to A/Victoria/210/2009 (2010/11 influenza vaccine strain). Nine (21%) of 43 influenza B(Victoria lineage) isolates were antigenetically different from B/Brisbane/60/2008 (2010/11 influenza vaccine strain). Influenza virus isolates in Hyogo prefecture were examined for drug resistance to oseltamivir by the analysis of genetic mutation. All of 87 A(H1N1)pdm09 isolates indicated negative 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患者では、肺炎等を併発して死に至ることがある。

2009 年にメキシコで新たに出現したインフルエンザ A(H1N1) 型 (以下 A(H1N1)pdm09) ウイルスの感染は

世界各地へと急速に拡大した。このシーズンは、通常、流行がみられない夏季から冬季にかけて大規模な流行が兵庫県内でも認められた。A(H1N1)pdm09 の流行初期は季節性の A 香港 (A(H3N2)) 型や A ソ連 (A(H1N1)) 型も一部検出されたが、流行の拡大と共にこれらは消失した¹⁾。出現から 2 シーズン目となる 2010/11 シーズンは、このウイルスの流行状況や性状変化等の動向が注目されたものの、季節性インフルエンザと比較して大きな差異がなかったことから、2011 年 4 月以降は通常の季節性インフルエンザとして取り扱われることになった。

一方、2011 年 8 月には、アメリカで A(H1N1)pdm09 ウイルスの M 遺伝子と、ブタ、ヒト、鳥由来の遺伝子を持つブタインフルエンザ A(H3N2) ウイルスのヒト感染

¹感染症部 ² 岡藤小児科医院 ³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

例が複数報告され^{2,3)}、新たな変異を持ったウイルスの再来が危惧されている。今後、これらの変異を含めたインフルエンザの性状変化の動向について引き続き注目していく必要がある。

我々は、感染症発生動向調査の一環として病原体定点医療機関で採取されたインフルエンザ様患者の検体や重症・集団サーベイランスの検体について、ウイルス分離、同定、抗原解析や薬剤耐性、遺伝子解析を行ってきた。本稿では、2010/11 シーズンにおけるこれらの調査結果について報告する。

II 材料と方法

1. 検体

2010年第46週(11月15日～11月21日)から2011年第25週(6月20日～6月26日)に県内の病原体定点医療機関で採取された284検体および重症・集団サーベイランスの48検体の合計332検体を材料とした。

2. インフルエンザウイルスの遺伝学的同定

A(H1N1)pdm09, A(H3N2)型, B型ウイルスの同定は、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 法あるいは Conventional 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%CO₂ の条件で 33°C, 7 日間培養した⁴⁾。細胞変性効果がみられた細胞の培養上清は、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^{5,6)}。

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 A(H1N1)pdm09, A(H3N2) および B 型の同定及び抗原解析は、赤血球凝集抑制 (HI) 試験法を用いた^{5,6)}。また、HI 試験には、国立感染症研究所より分与されたワクチン株あるいはレファレンス株(A/California /07/2009 A(H1N1)pdm09, A/Uruguay/716/2007 A(H3N2), B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統), B/Bangladesh/3333/2007 (山形系統) 株) に対するフェレット抗血清を用いた。これらの抗血清とワクチン株との HI 価 (ホモ HI 価) と分離株の HI 価を比較して抗原性を調べた。

5. インフルエンザウイルスの遺伝子解析

Conventional RT-PCR 法により HA 遺伝子の HA1 領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列

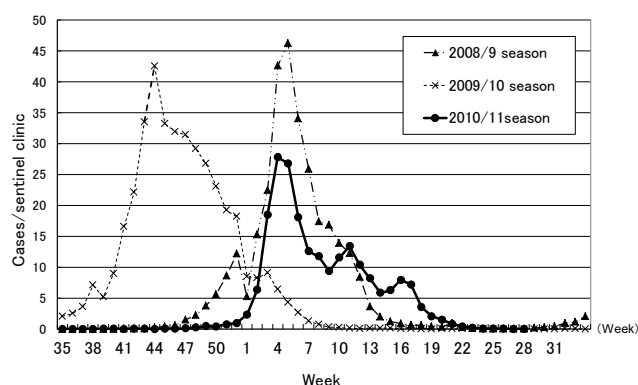


Fig. 1 Weekly cases of Influenza-like illness per sentinel clinic from 2008/09 season to 2010/11 season in Hyogo prefecture.

を決定し、Neighbor-Joining法により系統樹解析を行った。ワクチン株、レファレンス株等のシーケンス情報は、GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influenza Data) のデータベース (EpiFlu™) より引用した。また、引用した株はEpiFlu™ のIsolate IDを付した。

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、国立感染症研究所が示したDuplex one-step RT-PCR 法⁷⁾により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
感染症発生動向調査による2010/11シーズンの医療機関定点あたりの週別インフルエンザ様疾患患者数を Fig. 1 に示した。

2011年第1週(1月4日～11日)に定点あたりの患者報告数が流行の目安とされる1.0人を超え、第20週まで持続した。一方、全国の調査⁸⁾では、1.0人を超えた期間は2010年第50週から2011年第21週までの24週間であり、本県は全国と比べて4週間短かった。

本県の流行は第4週(1月24日～30日)に最大のピーク(27.8人)となり、その後、第11週(3月14日～20日)に第2のピーク(13.4人)、第16週(4月18日～24日)に第3のピーク(8.0人)が形成され、例年にない特異な形態となった。これらの流行ピークは共に警報レベルの30人に達することなく、過去3シーズンで最も低いピークとなった。一方、全国の流行のピーク⁸⁾は、本県と同じく第4週(31.9人)、第11週及び第16週にピ

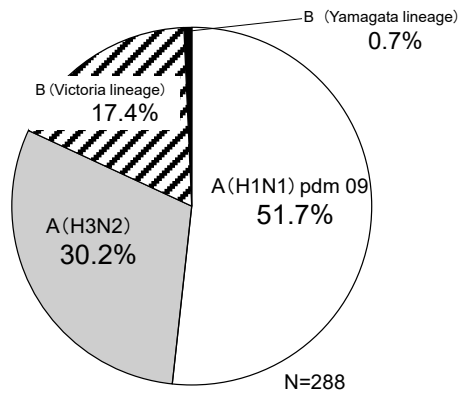


Fig. 2 Proportion of isolation/detection of influenza virus during 2010/11 season in Hyogo prefecture, Japan

ークを示す 3 峰性の流行パターンであった。

当研究センターに搬入された 332 検体のうち 288 検体 (86.7%) からインフルエンザウイルスが検出された。ウイルスの型及び亜型別の内訳は A(H1N1)pdm09 が 149 検体 (51.7%), A(H3N2)型が 87 検体 (30.2%), B 型 (Victoria 系統) が 50 検体 (17.4%), B 型 (山形系統) が 2 検体 (0.7%) であった (Fig. 2)。また、昨シーズンまで検出されていた季節性の A(H1N1)型はシーズンを通して検出されなかった。全国のウイルスの検出状況⁸⁾は、A(H1N1)pdm09 が 52%, A(H3N2)型が 32%, B 型 Victoria 系統 が 15%となっており、本県と全国の状況とほぼ同様であった。

ウイルスの検出状況 (Fig. 3)を週別にみると、A(H1N1)pdm09 は 2010 年第 51 週 (12 月 20 日~12 月 26 日)から検出され始め、2011 年第 3 週 (1 月 17 日~1 月 23 日)が最も多く、その後減少したが第 10 週 (3 月

7 日~3 月 13 日)まで連続して検出された。A(H3N2)型については、2010 年第 50 週 (12 月 13 日~12 月 19 日)から検出され始め、第 1 週を除いて 2011 年第 21 週 (5 月 23 日~5 月 29 日)まで連続して検出され、2011 年第 11 週 (3 月 14 日~3 月 20 日)にピークが見られた。B 型は、シーズン中で最も早い 2010 年第 48 週 (11 月 29 日~12 月 5 日)に検出され、最も遅い 2011 年第 22 週 (5 月 30 日~6 月 5 日)まで検出が続いた。最も多く検出されたのは、2011 年第 15 週 (4 月 11 日~4 月 17 日)であった。

Fig. 1 に示したように本県の 2010/11 シーズンの流行は例年がない 3 峰性のパターンとなった。これらの流行のピークと Fig. 3 に示した A(H1N1)pdm09, A(H3N2)型, B 型の検出のピークの時期がほぼ一致していることから、第 4 週の最も大きい流行のピークは A(H1N1)pdm09 が、2 番目に大きい第 11 週のピークは A(H3N2)型が、最も小さい第 16 週のピークは B 型の順に流行のピークを形成したものと考えられた。

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 Fig. 4 に示した。

分離した A(H1N1)pdm09 の 101 株について、ワクチン株である A/California/07/2009 株の抗血清を用いて HI 試験を行った。その結果、この抗血清とワクチン株間のホモ HI 価との差は全て 4 倍以内に収まっており、抗原性が異なるとされる 8 倍以上の株はなかった。このため県内の A(H1N1)pdm09 の流行株の多くは A/California/07/2009 類似株と考えられた。

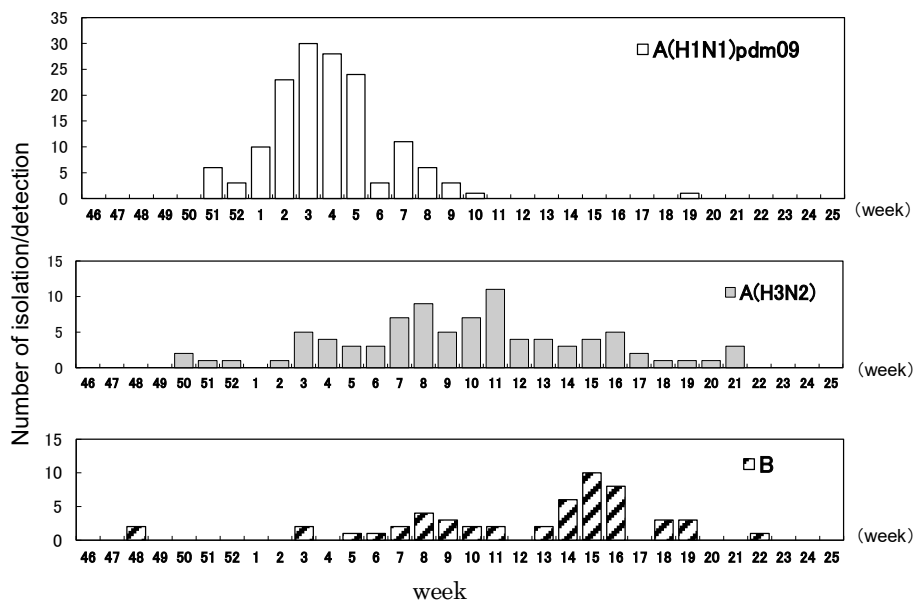


Fig. 3 Weekly isolation/detection of influenza virus during 2010/11 season in Hyogo prefecture, Japan

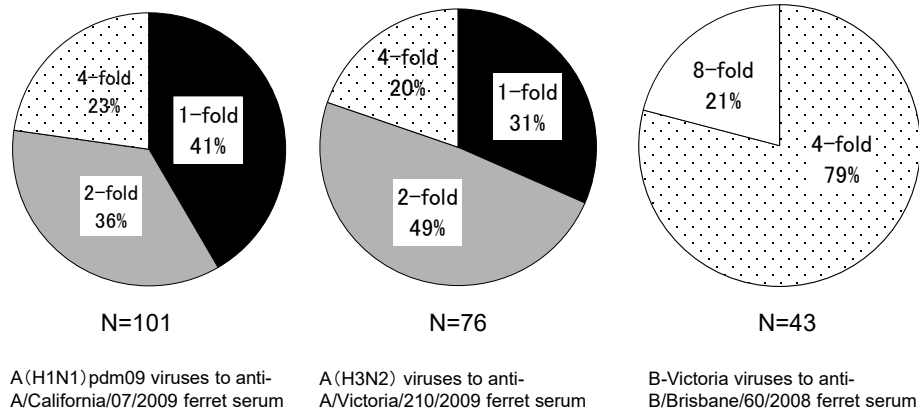


Fig. 4 The difference of HI titers of influenza viruses isolated in 2010/11 season to the reference antisera

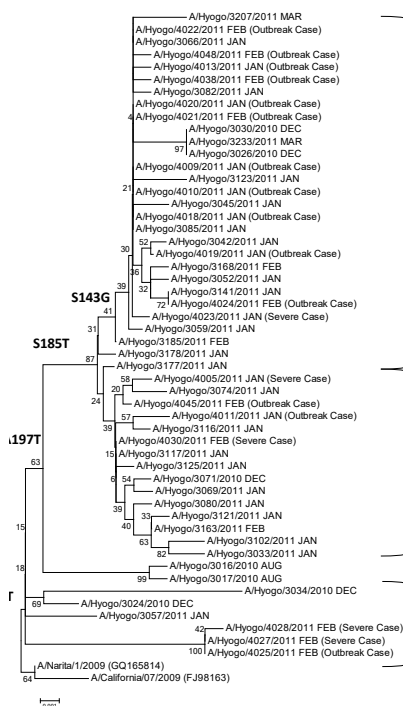


Fig. 5 Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1) pdm09 HA genes (HA1)

国立感染症研究所による全国調査⁸⁾でも、3,805株中8倍以上の抗原性の異なる株は1株のみであり、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、県内の分離株と同様の結果となった。

A(H3N2)型についてもワクチン株である A/Victoria/210/2009株の抗血清によるHI試験で、解析した76株すべてがホモHI価との差が全て4倍以内に収まっており、抗原性が異なるとされる8倍以上の変異株は検出されなかった。全国の分離株2,319株の解析結果⁸⁾では、HI価が8倍以上抗原性の異なる株はなく、A(H3N2)型の流行ウイルスは、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、県内の分離株と同様の結果であった。

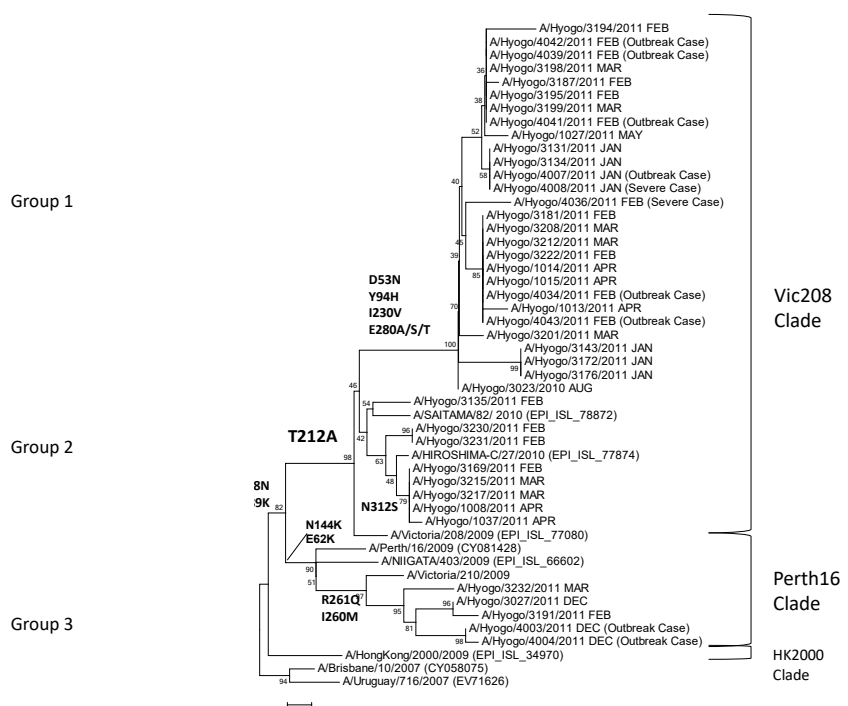


Fig. 6 Phylogenetic analysis of influenza A(H3N2) HA genes (HA1)

B型Victoria系統のワクチン株であるB/Brisbane/60/2008株の抗血清によるHI試験では、解析した43株のうち9株(21%)がホモHI価との差が8倍以上あり、これらは抗原変異株と判定された。一方、全国の分離株に中国、台湾、ラオスを加えた調査⁸⁾では、222株の中でHI価の差が8倍以上の株が3%であったと報告されており、県内のB型Victoria系統の分離株は、抗原変異株の占める割合が高いことがわかった。

また、今回分離したB型山形系統の2株はレファレンス株であるB/Bangladesh/3333/2007株と抗原的に類似していた。

3. 県内分離ウイルス株の遺伝子解析

A(H1N1)pdm09 分離株の HA1 遺伝子領域の系統樹解析の結果を Fig. 5 に示した。2010/11 シーズンの分離株は、本ウイルスが出現した当初の/California/07/2009 株と比較して、すべて S203T のアミノ酸置換を持っており、これに加えてさらに異なるアミノ酸の置換が認められた。これらは大きく HA 蛋白の 143, 185 及び 197 番目のアミノ酸の置換の有無によって 3 つのグループに分類された。すなわち A197T, S185T, S143G 置換を持つグループ 1 と、A197T, S185T 置換を持ち S143G 置換がないグループ 2 と、A197T, S185T, S143G 置換のないグループ 3 である。

ワクチン株がその抗血清に対する HI の反応性が低下するとされる G155E 置換が 4 株、N156N/D 置換が 1 株に見られた。しかし、ウイルス分離を経ない臨床検体の直接解析ではこれらの置換は認められなかったことから、今回見出された置換は MDCK 細胞でのウイルス増殖の過程で生じたものと考えられた。

A(H3N2)分離株の系統樹解析結果 (Fig. 6) は、T212 A 置換を持つ Victoria/208 クレード及び N144K, E62K 置換を持つ Perth/16 クレード、香港/2000 クレードの 3 つに分類される⁸⁾が、2010/11 シーズンの分離株は、Victoria/208 クレードあるいは Perth/16 クレードのいずれかに属していた。今回の Victoria/208 クレードに属する株は、さらに D53N, Y94H, I230V, E280A/S/T 置換を持つサブクレードと N312S 置換を持つサブクレードを形成していた。一方、Perth/16 クレードに属する株は、

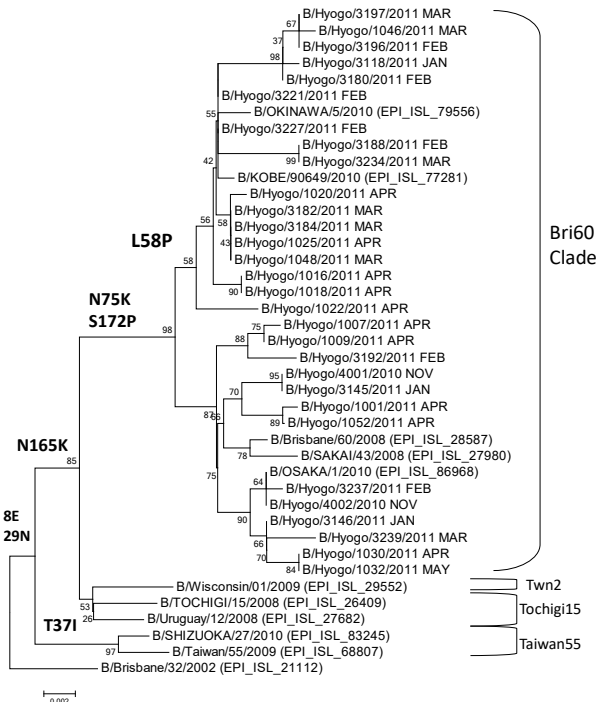


Fig. 7 Phylogenetic analysis of influenza B (Victoria-lineage) HA genes (HA1)

I260M, R261Q 置換を伴っていた。遺伝子レベルでは異なるクレードに属するいずれの分離株も抗原性はワクチン株に類似していた。

B 型 Victoria 系統は、ワクチン株である A/Victoria/210/2009 株に代表される Brisbane/60, 台湾/55, 栃木/15 及び Twn2 の 4 クレードに分類される⁸⁾ (Fig. 7) が、2010/11 シーズンの分離株は、すべて Brisbane/60 クレードに属しており、さらに L58P 置換を持つサブクレードとそれ以外のサブクレードに分類された。

B 型山形系統は、かつてのワクチン株 B/Florida/4/2006 株を代表株とするクレード 1 と B/Sendai-H/114/2007 を代表株とするクレード 2 およびレファレンス株である B/Bangladesh/3333/2007 を代表株とするクレード 3 に分類される⁸⁾ (Fig. 8) が、今回の県内で分離した株 2 株はクレード 3 に属し、N202S 及び N116K の置換を伴っていた。

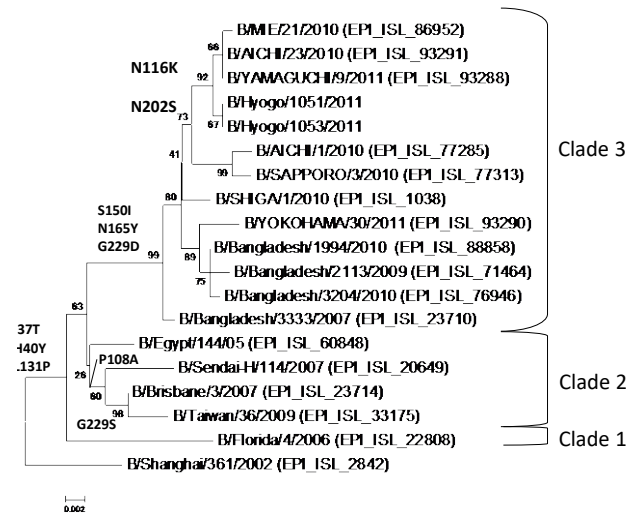


Fig. 8 Phylogenetic analysis of influenza B (Yamagata-lineage) HA genes (HA1)

4. 抗インフルエンザウイルス薬剤耐性マーカーの検索
 県内で分離した A(H1N1)pdm09 の 87 株について抗インフルエンザウイルス薬剤耐性マーカーを検索した結果、すべて感受性と判定されオセルタミビル耐性株は検出されなかった。全国の状況⁸⁾では、3,805 株のうち 78 株の耐性株が検出され、検出率は 2.0%であったと報告されている。耐性株の占める割合は低率であるものの、今後更に拡大することも考えられ、引き続き監視をしていく必要がある。

IV 要旨

兵庫県における 2010/11 シーズンのインフルエンザは、A(H1N1)pdm09(51.7%), A(H3N2)型(30.2%), B 型(18.

1%)ウイルスによる混合流行であった。また、流行の曲線は例年のない3峰性のパターンを示し、これらの各々のピークは、ウイルスの検出状況からA(H1N1)pdm09, A(H3N2)型, B型の順に流行が反映された結果と考えられた。HI試験による抗原解析の結果, A(H1N1)pdm09は解析した株すべてがワクチン株であるA/California/07/2009類似株であった。A(H3N2)型は76株のすべてがワクチン株のA/Victoria/210/2009類似株であった。B型Victoria系統の分離株は43株中9株(21%)がワクチン株のA/Victoria/210/2009と比べてHI価が8倍以上異なっていた。A(H1N1)pdm09の87株からはオセルタミビル耐性株は検出されなかった。

文 献

- 1) 押部智宏, 齋藤悦子, 榎本美貴, 高井伝仕, 山口幹子, 辻英高, 山本昭夫, 岡藤輝夫, 飯尾潤, 近平雅嗣: 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分離株の性状解析. 兵庫県立健康生活科学研究センター健康科学研究センター研究報告, **2**, 1-4 (2011)
- 2) Swine-origin influenza A(H3N2)virus infection in two children-Indiana and Pennsylvania, July-August 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, **60**, 1213-1215 (2011)
- 3) Limited human-to-human transmission of novel influenza A(H3N2)virus-Iowa, November 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, **60**, 1615-1617 (2011)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T: influenza virus surveillance group of Japan.: Rapid discrimination of oseltamivirresistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*, **83**, 1121-1127 (2011)
- 8) 岸田典子, 高下恵美, 藤崎誠一郎, 徐 紅, 伊東玲子, 土井輝子, 江島美穂, 金 南希, 菅原裕美, 佐藤 彩, 今井正樹, 小田切孝人, 田代真人, 本村和嗣, 横山勝, 柗元巖, 佐藤裕徳, 小口晃央, 山崎秀司, 藤田信之, 地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ: IASR病原微生物検出情報(月報), **32**, 第11号, 314-323 (2011)
- 9) 岸田典子, 高下恵美, 藤崎誠一郎, 徐 紅, 伊東玲子, 土井輝子, 江島美穂, 金 南希, 菅原裕美, 佐藤 彩, 今井正樹, 小田切孝人, 田代真人, 本村和嗣, 横山勝, 柗元巖, 佐藤裕徳, 小口晃央, 山崎秀司, 藤田信之, 地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ: IASR病原微生物検出情報(月報), **31**, 第9号, 248-260 (2010)