

[ノート]

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

押部 智宏^{1*} 齋藤 悦子¹ 榎本 美貴¹ 高井 伝仕¹ 山口 幹子¹ 山本 昭夫¹
 沖 典男¹ 辻 英高¹ 岡藤 輝夫² 飯尾 潤³ 近平 雅嗣¹

Characteristic Analysis of the Epidemic Influenza Viruses Isolated in Hyogo
 Prefecture, Japan in 2008/09 Season.

Tomohiro OSHIBE¹, Etsuko SAITO¹, Miki ENOMOTO, Denshi TAKAI¹,
 Mikiko YAMAGUCHI¹, Akio YAMAMOTO¹, Norio OKI¹, Hidetaka TSUJI¹,
 Teruo OKAFUJI², Jyun IIO³, and Masatsugu CHIKAHIRA¹

¹ *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 and* ² *Okafuji Pediatric Clinic and* ³ *Hyogo Prefectural Tsukaguchi Hospital*

During the 2008/09 flu season 52% of influenza viruses isolates was type AH3 in Hyogo prefecture. AH3 was mainly isolated from 47th week to 52nd week, 2008, in Hyogo prefecture. However, in nation wide, the major epidemic strains was type AH1 through the flu season. AH1 pdm occupied the mainstream of the flu infection after May, 2009 in Hyogo prefecture.

All of 16 type AH1 isolates were antigenetically similar to A/Brisbane/59/2007, adapted to the component of 2008/09 influenza vaccine. 27 of 31 type AH3 were antigenetically similar to A/Uruguay/716/2007 (2008/09 influenza vaccine isolate), but the other 4 isolates showed reduced HI titers with antisera.

Influenza virus isolates in Hyogo prefecture have been tested for resistance marker to oseltamivir and adamantanes by detection of genetic sequence mutation. All of 16 type AH1 isolates tested positive for oseltamivir resistance and negative for adamantanes resistance. All of 24 type AH3 tested positive for adamantanes resistance and negative for oseltamivir resistance. All of 32 type AH1pdm isolates tested negative for oseltamivir resistance.

I はじめに

インフルエンザは、毎年冬季に幼児や児童を中心として流行する急性の呼吸器感染症である。患者は通常1週間程度で軽快するが、高齢者や気管支喘息、糖尿病等の

基礎疾患があると、肺炎等を併発して重症化することがある¹⁾。これまで毎年ヒトの間で流行する季節性インフルエンザウイルスは、AH1 (Aソ連) 型、AH3 (A香港) 型、B型であったが、2009年3月にメキシコで出現した新型インフルエンザウイルス (以下AH1pdm) は、アメリカ合衆国で初めて確認されて以来、瞬く間に世界各国へと感染が拡大した。国内では、5月16日 (第20週) に神戸市で最初の国内発生例が確認され、県内でも多数の患者が発生した。

当研究センターでは、従来から流行ウイルスの性状を

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

把握することを目的として、県内の患者からのインフルエンザウイルスの分離、型（亜型）同定、薬剤耐性マーカーの検索等の性状解析を行っており、2009年5月（第20週）以降は、さらに Real-Time RT-PCR 法による AH1pdm の迅速検出を実施している。本稿では 2008/09 シーズンの県内のインフルエンザウイルスの分離・検出状況及びその性状について報告する。

II 材料と方法

1. インフルエンザウイルス検体

2008年第46週（11月10日～16日）から2009年第12週（3月16日～22日）に姫路市、尼崎市、豊岡市の小児科医療機関の3つの病原体定点で採取された咽頭または鼻腔ぬぐい液132検体、および、学校等の4施設において発生したインフルエンザを疑う集団感染事例で採取された咽頭ぬぐい液12検体、合計144検体を分離材料として供試した（Table 1）。

また、2009年第20週（5月11日～17日）から第35週（8月24日～30日）までに AH1pdm の迅速同定を目的として健康福祉事務所から搬入された290検体を用いた。

2. 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℃、7日間培養し、3代盲継代した²⁾。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^{3,4)}。

3. インフルエンザウイルスの迅速同定

AH1pdm, AH1型, AH3型の検出は、病原体検出マニュアル「H1N1 新型インフルエンザ」2009年5月 Ver.1（国立感染症研究所）に準じて Real-Time RT-PCR 法お

Table 1 Isolation of influenza viruses in Hyogo prefecture from 46th week, 2008 to 12th week, 2009

Sampling points	Samples	Isolates	Type		
			A/H1	A/H3	B
Fixed points of surveillance					
Himeji	61	37	5	18	14
Amagasaki	70	34	8	19	7
Toyouka	1				
Public health and welfare centers					
Tatsuno	3	3	3		
Fukusaki	3	3			3
Ako	5	5		5	
Itami	1	1			1
Total	144	83	16	42	25

よび RT-PCR 法により行った。

4. インフルエンザウイルス株の同定及び抗原解析

AH1, AH3 型及び B 型系統型別の同定及び抗原解析は、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/Brisbane/59/2007（AH1 型）、A/Uruguay/716/2007（AH3 型）、A/Brisbane/7/2006（B 型）、山形系統、B/Florida/4/2006（B 型）、Victoria 系統）を用いて赤血球凝集抑制（HI）試験を行った^{3,4)}。

5. 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 遺伝子の H275Y のアミノ酸置換、及びアマンタジンに耐性を示す M 遺伝子の V27A, A30V/T, S31N のアミノ酸置換について、RT-PCR 法により増幅した産物をダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定して変異の有無を検索した。

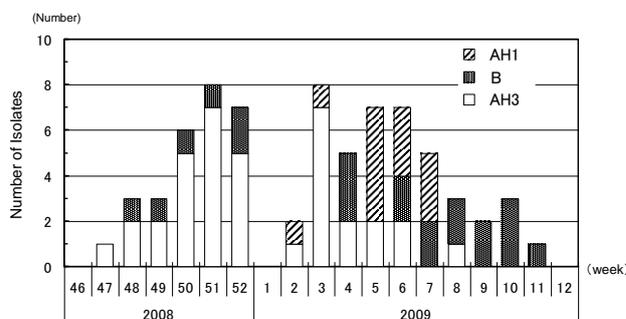


Fig. 1 Weekly isolation of influenza viruses in Hyogo prefecture of surveillance fixed points from 46th week, 2008 to 12th week, 2009

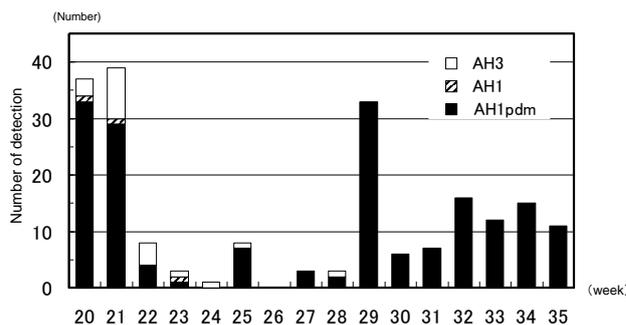


Fig. 2 Weekly detection of influenza viruses in Hyogo prefecture from 20th week to 35th week, 2009

III 結果および考察

1. インフルエンザウイルスの分離状況

2008/09 シーズンの当研究センターにおけるインフルエンザウイルスの分離状況を Table 1 に、また Fig. 1 にサーベイランス定点における週別インフルエンザウイルスの分離状況を示した。

Table 2 Hemagglutination inhibition tests of isolates to the reference antisera

Type	Multiple number of HI titers against the reference antisera*			Total
	≤2-fold	4-fold	≥8-fold	
AH1	8	5		13
AH3	17	10	4	31
B (Yamagata lineage)	3			3

* The reference antisera is A/Brisbane/59/2007 ferret serum (AH1), anti-A/Uruguay/716/2007 ferret serum (AH3), anti-A/Brisbane/7/2006 ferret serum (B.Yamagata lineage)

当センターに搬入された 144 検体から 83 株のウイルスが分離され、分離率は 58%であった。このうちサーベイランス定点における分離数は、AH1 型が 13 株 (18%)、AH3 型が 37 株 (52%)、B 型の Victoria 系統が 21 株 (30%) であり、AH3 型の占める割合が最も高く AH1 型が最も低い結果となった。

神戸市では、AH1 型が 34 株 (29%)、AH3 型が 52 株 (44%)、B 型 Victoria 系統が 31 株 (26%) と報告され⁵⁾、これも AH3 型の割合が最も高かった。

一方、全国の分離状況 (2008 年 10 月～2009 年 3 月) をみると AH1 型が 3,508 株 (52%)、AH3 型が 1,592 株 (24%)、B 型が 1,639 株 (24%) であり⁶⁾、AH1 型の占める割合が最も高く、県内の分離状況と異なる結果となった。

サーベイランス定点における週別インフルエンザウイルスの分離状況 (Fig. 1) では、2008 年第 47 週に AH3 型が初めて分離されて以降、第 52 週までに AH3 型、B 型がそれぞれ分離され、AH3 型が全体の 79%を占めた。

2009 年以降では、第 2 週に初めて AH1 型が分離され、第 12 週までに AH1 型が 16 株 (29%)、AH3 型が 20 株 (36%)、B 型が 19 株 (34%) 分離され、AH1 型、AH3 型、B 型がほぼ同じ割合であった。

これらのことから 2008/09 シーズンは AH1 型、AH3 型、B 型が混合流行し、全国的には AH1 型が主流であったが、県内は AH3 型が主流であったと考えられた。また、2008 年第 47 週～第 52 週の県内の流行は AH3 型が主体であり、2009 年第 1 週～第 12 週は AH1 型、AH3 型、B 型がほぼ同じ割合で混合流行していたものと推察された。

学校施設等の集団感染事例については、2008 年第 50 週に龍野健康福祉事務所管内の小学校で集団感染した児童から AH1 型が 3 株分離され、同時期に福崎健康福祉事務所管内の小学校で集団感染した児童から B 型 (山形系統) が 3 株、伊丹健康福祉事務所管内の小学生から B 型 (Victoria 系統) が 1 株分離された。

Table 3 Antiviral resistance marker testing results on samples collected during 2008/ 09 season

Type	Oseltamivir (HA gene:H275Y)		Adamantanes (M gene: V27A,A30V/T,S31N)	
	Samples tested (n)	Antiviral Resistance Marker,Number	Samples tested (n)	Antiviral Resistance Marker,Number
Seasonal Influenza A (AH1)	16	16	12	0
Seasonal Influenza A (AH3)	24	0	24	24
2009 Influenza A (AH1pdm)	32	0	3	3

2. 2009 年第 20 週以降のインフルエンザウイルスの検出状況

2009 年第 20 週 (5 月 11 日～17 日) から第 35 週 (8 月 24 日～30 日) までのウイルスの検出状況を Fig. 2 に示した。

当研究センターに搬入された 290 検体のうち 202 検体 (70%) がインフルエンザ陽性で、このうち AH1pdm が 179 検体 (89%)、AH1 型が 3 検体 (1.5%)、AH3 型が 20 検体 (10%) であり、B 型は検出されなかった。AH1 型は第 23 週、AH3 型は第 28 週まで検出されたものの、それ以降は、AH1pdm のみが検出された。

全国の検出状況では、流行が終息に向っていた 4～5 月に AH3 亜型が再増加、5 月以降新型の AH1pdm が大きく増加するという特異な流行パターンとなっており⁷⁾、今回の結果から県内でも全国と同様のパターンで流行したものと考えられた。

3. 県内分離株の抗原解析

2008/09 シーズンに兵庫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 2 に示した。

AH1 型のワクチン株である A/Brisbane/59/2007 の抗血清による HI 試験では、抗血清と同じ抗原を用いた HI 価 (ホモ HI 価) との差が 2 倍以内であった株が 8 株、4 倍は 5 株であり、8 倍以上の大きく抗原性の異なる変異株はなかった。これらの結果から県内の AH1 型の流行株の多くは A/Brisbane/59/2007 類似株と考えられた。

全国の結果では、2008 年 9 月～2009 年 2 月の分離された株の 94%が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⁷⁾、県内の分離株と同様であることが分かった。

AH3 型のワクチン株である A/Uruguay/716/2007 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 17 株で最も多く、4 倍が 10 株、8 倍以上の大きく抗原性の異なる変異株は 4 株であった。このことからワクチン株との抗原類似株と変異株が混在していたことが分かった。全国の結果では、2008/09 シーズ

ン前半（2008年9月～2009年2月）は、解析した分離株の72%がワクチン株 A/Uruguay/716/2007 の類似株で占められ、シーズン後半（2009年3月～8月）になると、抗原変異株が分離株の75%を占めるようになったことが報告されており、全国のシーズン前半の結果は、県内の結果と同様であることが判明した。

B型の山形系統の分離株3株は、ワクチン株である A/Brisbane/7/2006 の抗血清による HI 試験で2倍以内であったのが3株であった。Victoria 系統については、国立感染症研究所で作製した B/Brisbane/60/2008 株の抗血清が、糖鎖の欠失による抗原性の変化により MDCK 細胞分離株とほとんど反応しないことが報告された⁹ことから、抗原解析の評価を行わなかった。

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について Table 3 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16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、耐性株であった。AH3 型については、解析した24株すべてアミノ酸置換がなくオセルタミビルに感受性であった。AH1pdm も解析した32株すべてがアミノ酸置換のない感受性株であった。

一方、アマンタジンに耐性を示す M 遺伝子の V27A, A30V/T, S31N のアミノ酸置換については、AH1 型の12株はすべてこれらのアミノ酸置換はなく、AH3 型は解析した24株のすべてに S31N のアミノ酸置換があり耐性であった。AH1pdm については、解析した3株すべてに S31N のアミノ酸置換がありアマンタジンに耐性を示した。

全国の耐性株の検出状況では、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 (99.7%) であった⁷ことが報告された。アマンタジンについては、AH1 型の国内分離株は 1/143 (0.7%) が耐性株であり極めて少なく、AH3 型および AH1pdm はアマンタジンに耐性を獲得している⁷ことが報告されており県内分離株もこれらの結果と同様であることが分かった。

IV 要 旨

2008/09 シーズン (2008年11月～2009年3月) の兵

庫県内のインフルエンザ定点で分離した株のうち 52% (37株) を AH3 型が占めた。特に第47週から第52週までの流行は AH3 型が主体であり、2009年第3週～第12週は AH1 型, AH3 型, B 型がほぼ同じ割合で流行したものと考えられた。2009年第20週以降は AH1pdm が流行の主体となった。

AH1 型株は解析した16株すべてがワクチン株である A/Brisbane/59/2007 の抗血清に対して4倍以下となりワクチン類似株であった。AH3 型株は解析した31株のうち27株がワクチン株である A/Hiroshima/52/2005 の類似株であったが、残りの4株は抗原変異株であった。

薬剤耐性マーカーを検索した結果、解析した AH1 型株16株すべてがオセルタミビル耐性変異を持ち、また AH3 型株24株すべてがアマンタジンの耐性変異株であることが判明した。

文 献

- 1) Cox, N. J., Kawaoka, Y.: Orthomyxoviruses : influenza, in Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. Virology, **9**, 407-409 (1998)
- 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) 神戸市感染症発生動向調査週報 (2009年第16週), 神戸市 (2009)
- 6) IASR 病原微生物検出情報 (月報), **30**, 第12号, 332 (2009)
- 7) IASR 病原微生物検出情報 (月報), **30**, 第11号, 285-286 (2009)