

## 広島市で検出されたインフルエンザウイルス 抗原および遺伝子解析(2013/2014 シーズン)

山本 美和子    田中 寛子    瀧口 由佳理    藤井 慶樹  
京塚 明美    石村 勝之

### はじめに

インフルエンザは毎年冬期に流行を繰り返す。主にヒトに対しては急な発熱や呼吸器症状を呈するが、肺炎や脳炎など重篤な合併症を引き起こすこともあり、特に小児や高齢者では死に至ることもある疾患である。

インフルエンザは変異しやすく、抗原性が変わるため、ワクチン株の選定は、国内の流行状況、分離ウイルスの抗原性や遺伝子解析、抗体保有状況などの詳細な調査をし、さらに WHO の提唱した北半球次シーズンに対する推奨株の情報等の検討がなされ決定される<sup>1)</sup>。そのため、流行株の詳細な解析が重要となってくる。

国内の分離株については、国立感染症研究所により、全国から無作為に抽出され集められたウイルス分離株のさまざまな解析が行われているが、今回、広島市においてウイルス分離できた株の抗原解析、遺伝子解析について行った結果についてまとめたので報告する。

### 方 法

#### 1 材料

2013 年 9 月から 2014 年 4 月までに、広島市感染症発生動向調査事業の定点医療機関を受診し、インフルエンザ様症状を呈した患者および集団かぜの患者 108 人から採取した咽頭ぬぐい液、鼻汁、髄液を用いた。

#### 2 ウイルス分離および抗原解析

ウイルス分離には MDCK(イヌ腎臓由来上皮)細胞を使用した。3,000rpm, 15 分遠心した検体の上清を細胞に接種し、トリプシン加 MDCK 用培地を添加し、34°C5%炭酸ガス培養した。1 週間観察、1 代継代した後さらに 1 週間観察した。その間に細胞変性効果(CPE)がみられたものについて国立感染症研究所から配布された 2013/14 シーズンキット A/California/7/2009, A/Texas/50/2012, B/Brisbane/60/2008, B/Massachusetts/02/2011) を使用し、赤血球凝集抑制(HI)試験を行った。血球は 0.75%モルモット血球を用いた。

#### 3 遺伝子型別検査

国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに準じて遺伝子検出を行った。患者の咽頭拭い液、鼻汁および髄液 140 μl を用い、QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN 製)で RNA を抽出した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit およびオリゴ dT プライマー(ライフテクノロジー製)を使用し cDNA を合成した。TaqMan Fast Advanced Master Mix(ライフテクノロジー製)を用いて Real-time PCR を行い、型別した。

#### 4 A(H1N1)2009 薬剤耐性遺伝子(H275Y)解析

2013/2014 シーズンインフルエンザウイルスの抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランス実施要綱に基づき実施した。MDCK 細胞で培養されたインフルエンザウイルスの培養上清を上述の遺伝子型別検査と同様に RNA 抽出し、cDNA を合成した。PCR を行い、増幅産物を電気泳動した。特異バンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN 製)でゲル精製を行った。BigDye X Terminator 精製キット(ライフテクノロジー製)で反応液を精製し、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザで塩基配列を決定した。アミノ酸へ変換し、耐性マーカである H275Y の有無を確認した。NA 遺伝子部分シーケンス法で行ったため、C(275H)と T(275Y)の波形の重複が見られ

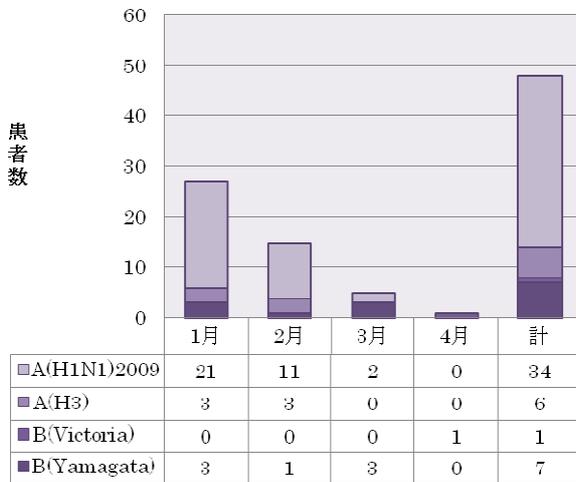


図 1 月別検出状況

表 1 分離株の HI 試験結果

採取日	株名	赤血球凝集抑制試験 (ホモ価)			
		A/カリフォルニア	A/テキサス	B/ブリスベン	B/マサチューセッツ
		/7/2009 (ホモ価: <b>1280</b> )	/50/2012 (ホモ価: <b>5120</b> )	/60/2008 (ホモ価: <b>320</b> )	/02/2012 (ホモ価: <b>80</b> )
2014/01/03	A/Hiroshima-C/1/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/01/08	A/Hiroshima-C/3/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/01/08	A/Hiroshima-C/4/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/01/09	A/Hiroshima-C/2/2014	<b>10240</b>	<10		
2014/01/10	A/Hiroshima-C/5/2014	<10	<b>2560</b>		
2014/01/17	A/Hiroshima-C/6/2014	<b>1280</b>	<10	<10	<10
2014/01/17	A/Hiroshima-C/7/2014	<b>2560</b>	<10	<10	<10
2014/01/20	A/Hiroshima-C/8/2014	<b>1280</b>	<10	<10	<10
2014/01/20	A/Hiroshima-C/10/2014	<b>5120</b>	<10	<10	<10
2014/01/20	A/Hiroshima-C/12/2014	<b>1280</b>	<10	<10	<10
2014/01/22	A/Hiroshima-C/11/2014	<b>1280</b>	<10	<10	<10
2014/01/22	A/Hiroshima-C/9/2014	<b>1280</b>	<10	<10	<10
2014/01/22	A/Hiroshima-C/13/2014	<b>2560</b>	<10	<10	<10
2014/01/23	A/Hiroshima-C/14/2014	<b>5120</b>	<10	<10	<10
2014/01/23	A/Hiroshima-C/17/2014	<b>2560</b>	<10		
2014/01/24	A/Hiroshima-C/15/2014	<b>5120</b>	<10	<10	<10
2014/01/24	B/Hiroshima-C/1/2014			<10	<b>320</b>
2014/01/25	A/Hiroshima-C/16/2014	<b>2560</b>	<10	<10	<10
2014/01/28	A/Hiroshima-C/18/2014	<b>2560</b>	<10		
2014/01/30	B/Hiroshima-C/2/2014			<10	<b>80</b>
2014/01/30	A/Hiroshima-C/20/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/02/05	A/Hiroshima-C/22/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/02/08	A/Hiroshima-C/19/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/02/13	A/Hiroshima-C/21/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/02/12	A/Hiroshima-C/24/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/02/14	A/Hiroshima-C/23/2014	<b>640</b>	<10		
2014/02/18	A/Hiroshima-C/26/2014	<b>2560</b>	<10		
2014/02/24	A/Hiroshima-C/25/2014	<b>1280</b>	<10		
2014/02/26	A/Hiroshima-C/27/2014	<10	<b>2560</b>		
2014/02/28	A/Hiroshima-C/28/2014	<10	<b>5120</b>		

ないか慎重に判定した。

### 5 HA 遺伝子解析

A(H1N1)2009 薬剤耐性遺伝子解析の際に合成した cDNA を用い、インフルエンザ診断マニュアル

に掲載されているプライマーのうち、A(H1N1)2009 型は Forward primer(F-primer):H1HA1-BEGIN, Reverse primer(R-primer):swine H1-596-578R および F-primer:swine H1-277-296F, R-primer:swine

A(H1N1)2009 型分離株の 抗 A/California/07/2009 に対する HI 価					
10240	5120	2560	1280 (ホモ価)	640	320
1株	3株	6株	14株	1株	0株

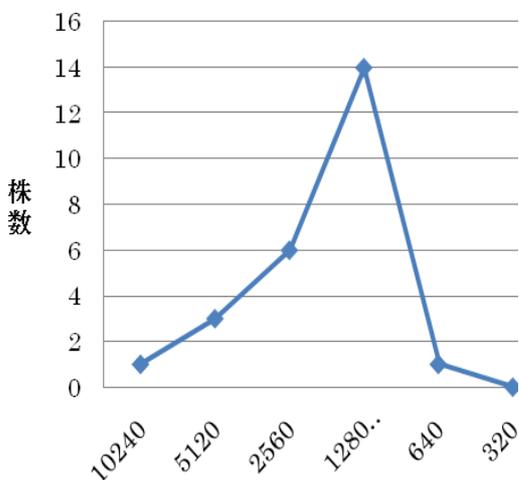


図2 抗原解析結果

H1-1106-1087R の 2 組, A(H3N2)型は, F-primer: H3HA1-BEGIN, R-primer:H3-1105-1125R, B 型は F-primer:BHA1-N, R-primer:BHA1-C を使用し, PCR を行った。A(H1N1)2009 薬剤耐性遺伝子解析と同様に塩基配列を決定し, 分子系統樹を作成した。

結 果

1 発生状況

108 人の患者のうち, 48 人からインフルエンザウイルスが検出された(図 1)。内訳は A(H1N1)2009 型が 34 人, AH3 型が 6 人, B 型が 8 人(山形系統 7 人, Victoria 系統 1 人)であった。A(H1N1)2009 型は 2009/2010 シーズン以来の大きな流行となった。2013/2014 シーズンは, A(H1N1)2009 型, AH3 型, B 型(山形系統, Victoria 系統)の混合流行であった。

2 抗原解析(表 1, 図 2)

国立感染症研究所から配布された 2013/2014 シーズンキットを使用した HI 試験の結果,

A(H1N1)2009 型の抗血清 A/California/07/2009 (ホモ価 1280)に対しては, HI 価 10240 が 1 株, 5120 が 3 株, 2560 が 6 株, 1280 が 14 株, 640 が 1 株であった。A/H3N2 の抗血清 A/Texas/50/2012(ホモ価 5120)に対しての HI 価は, 5120 が 1 株, 2560 が 2 株であった。B 型の抗血清, B/Massachusetts/02/2012(ホモ価 80)に対しての HI 価は 320 が 1 株, 80 が 1 株であった。

3 A(H1N1)2009 薬剤耐性遺伝子(H275)解析

ウイルス分離できた A(H1N1)2009 型 25 株のうち, 22 株について NA 遺伝子部分シーケンスを行い, 薬剤耐性マーカーである H275Y の確認を行った。1 株について 275 番目のアミノ酸がチロシンであることが確認できたため, 国立感染症研究所へ薬剤感受性試験を依頼した。その結果, オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビルおよびラニナミビルの IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 60.49nM, 13.53nM, 0.16nM および 0.45nM であり, オセルタミビルおよびペラミビルに対して耐性を示し, ザナミビルおよびラニナミビルに対して感受性を保持している株であった(表 2)。

4 HA 遺伝子解析

A(H1N1)2009 型は 2009/2010 シーズン以降に分離された株の一部も合わせ, 24 株を解析した。1034 塩基(344 アミノ酸)の配列を決定し, 系統樹解析を行った(図 3)。2009/2010 シーズンに分離された 8 株および 2010/2011 シーズンに分離された 3 株はワクチン株である A/California/07/2009 と同じクラスターであったのに対し, 2013/2014 シーズンに分離された 13 株は別のクラスターを形成した。

A(H3N2)型は 2011/2012 シーズン以降の分離株の一部も合わせ, 36 株を解析した。748 塩基(243 アミノ酸)の配列を決定し, 系統樹を作成した(図 4)。2013/2014 シーズンの分離株は 2012/2013 シーズンの分離株と近縁な株であった。

B 型は 2011/2012 シーズン以降の分離株の一部も合わせ, 25 株を解析した。997 塩基(331 アミノ酸)の配列を決定し, 系統樹を作成した(図 5)。2013/2014 シーズンに分離された 2 株はいずれも山形系統であり, 2012/2013 シーズンのワクチン

表 2 抗インフルエンザ薬剤耐性株薬剤感受性試験結果

ウイルス株名	IC <sub>50</sub> (nM)			
	オセルタミビル	ペラミビル	ザナミビル	ラニナミビル
A/Hiroshima-C/26/2014	60.49	13.53	0.16	0.45

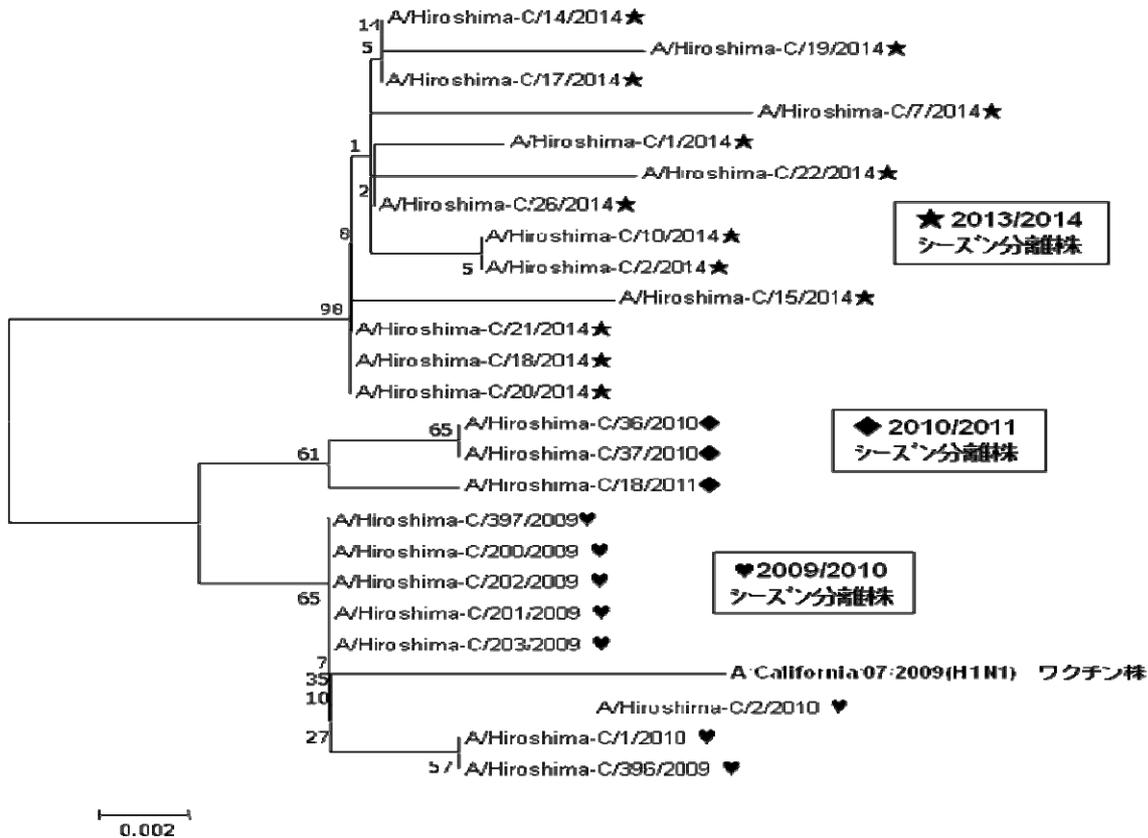


図3 インフルエンザウイルス A(H1N1) 2009 HA 遺伝子領域の分子系統樹 (344 アミノ酸)

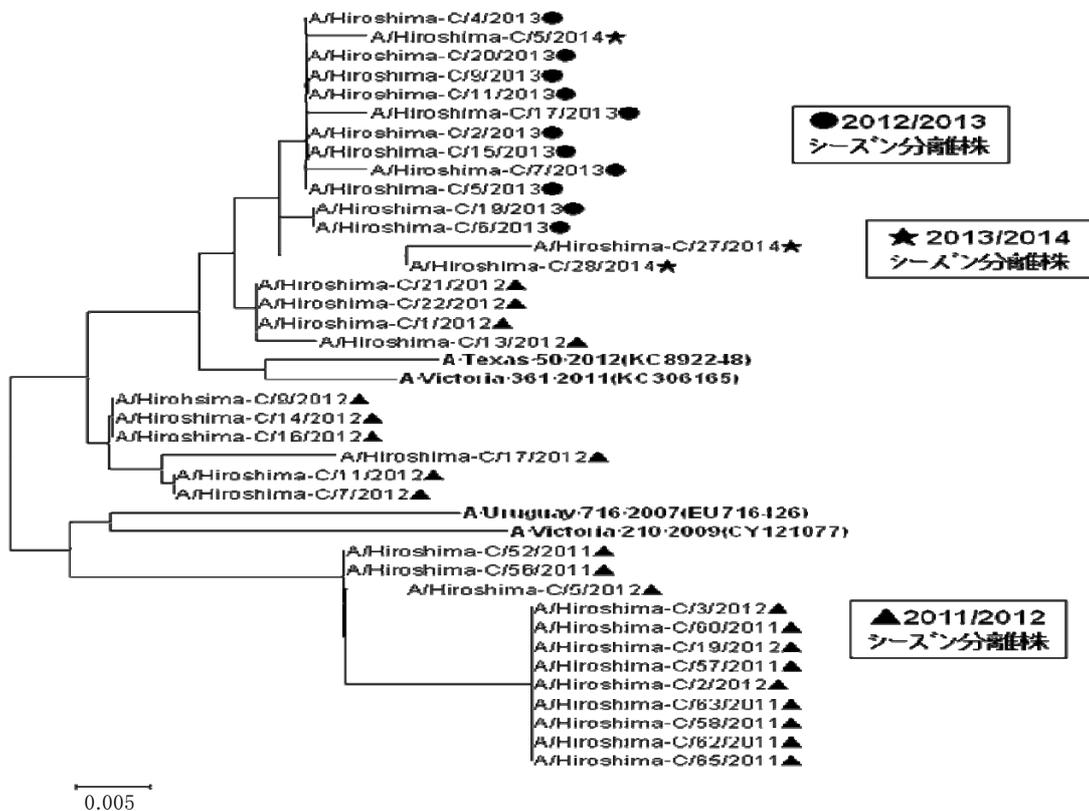


図4 インフルエンザウイルス (H3) HA 遺伝子領域の分子系統樹 (243 アミノ酸)

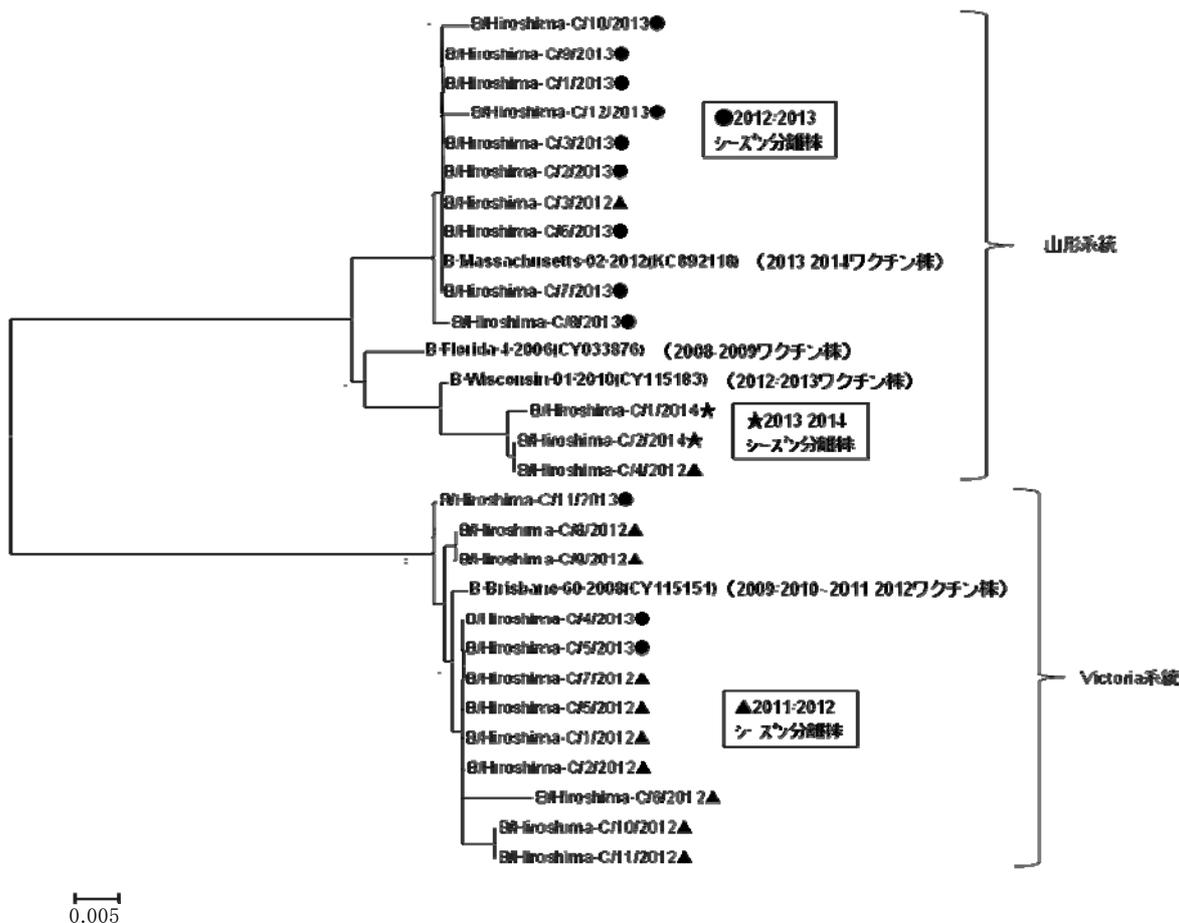


図5 B型インフルエンザウイルス HA 遺伝子領域の分子系統樹(331 アミノ酸)

株である B/Wisconsin/01/2010 と近縁な株であった。

考 察

2013/2014 シーズンは、4 シーズンぶりの A(H1N1)2009 型の大きな流行となった。HA 遺伝子解析結果では 2009/2010 および 2010/2011 シーズンの分離株はワクチン株と同じクラスターを形成していたが、2013/2014 シーズンの分離株は別のクラスターを形成していることが分かった(図 3)。2013/2014 シーズンの分離株はそれまでのシーズンの分離株と比べ抗原性が若干変化している可能性が示唆された。

A(H1N1)2009 型薬剤耐性遺伝子(H275Y)解析では、22 株解析したうち 1 株(4.5%)がオセルタミビルおよびペラミビルに対して耐性であった。全国的にも 4.2%の出現頻度<sup>2)</sup>であり、2012/2013 シーズンの出現頻度(1.8%)に比べ、若干増加している。かつて 2007/2008 シーズンには 2.6%であった A(H1N1)型(ソ連型)の薬剤耐性株が、2008/2009

シーズンには 99.6%<sup>3)</sup>になった状況を鑑みると、今後も引き続き薬剤耐性遺伝子解析を継続し、動向を注視する必要がある。

謝 辞

広島市感染症発生動向調査事業にご協力頂いた定点医療機関各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：平成 25 年度(2013/2014 シーズン)インフルエンザワクチン株の選定経過, IASR, 34, 336~339(2013)
- 2) 国立感染症研究所：抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2014 年 7 月 1 日, IASR(2014)
- 3) 国立感染症研究所：2008/2009 インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ(A/H1N1)オセルタミビル耐性株(H275Y)の国内発生状況[第 2 報], IASR, 30, 101~106(2009)