

## 広島市における 2011/12 シーズンインフルエンザウイルス 抗原および NA 遺伝子解析結果

山本美和子    田中 寛子    藤井 慶樹    阿部 勝彦\*1  
京塚 明美    橋本 和久\*2

### 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。

インフルエンザの原因となるインフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、A型、B型、C型がある。そのうち主にヒトのインフルエンザの原因になるのはA型とB型である。インフルエンザウイルスは突然変異を起こしやすく、ヒトではウイルスに対する免疫の持続も短いため、毎年流行を繰り返す。A型インフルエンザウイルスなど分節した遺伝子を持つウイルスは、抗原シフトと呼ばれる不連続変異により、過去のスペインかぜ(H1N1亜型)、アジアかぜ(H2N2亜型)、香港かぜ(H3N2亜型)などの、これまでヒトの間には存在しなかった新型が出現し、パンデミックを引き起こす。2009年の新型インフルエンザの出現は記憶に新しい。

インフルエンザウイルスは変異しやすく、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、抗体保有調査などの解析や適格性などのさまざまな検討がなされ決定される。そのため、流行株との抗原性の相違など継続した解析が必要となる。

インフルエンザ治療薬としては、A型に有効なM2阻害剤であるアマンタジンやリマンタジン、A型B型共に有効なNA(ノイラミニダーゼ)阻害剤であるザナミビルやオセルタミビル等が知られている。日本では、オセルタミビルが多く使用されているが、薬剤耐性ウイルスが出現する可能性があり、治療薬の見直し等が必要となることがあるため、薬剤耐性ウイルス出現に注意する必要がある。

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された株の抗原および遺伝子解析を行った結果についてまとめたので報告する。

### 方 法

#### 1 材料

2011年9月から2012年5月までに、広島市感染症発生動向調査事業により、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272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。3,000rpm15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2011/12シーズンキット[A/California/7/2009(H1N1pdm), A/Victoria/210/2009(H3N2), B/Brisbane/60/2008(Victoria系統), B/Bangladesh/3333/2007(山形系統)]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 遺伝子検査

国立感染症研究所の病原体検出マニュアル<sup>1)</sup>に準じて遺伝子検出を行った。患者の咽頭拭い液、

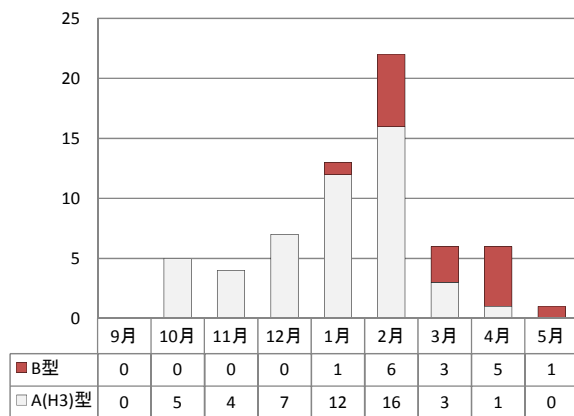


図1 インフルエンザウイルス遺伝子検出状況

\*1: 現 健康福祉局動物管理センター

\*2: 退職

表 1 抗原解析および NA 耐性遺伝子解析結果

採取日	株名	赤血球凝集抑制試験				NA 耐性遺伝子変異
		A/California/7/2009 (ホモ備 640)	A/Victoria/210/2009 (ホモ備 640)	B/Brisbane/60/2008 (ホモ備 640)	B/Bangladesh/3333/2007 (ホモ備 640)	
2011/10/24	A/HIROSHIMA-C/52/2011	<10	40	<10	<10	
2011/10/26	A/HIROSHIMA-C/56/2011	<10	80			
2011/10/29	A/HIROSHIMA-C/53/2011	<10	40	<10	<10	
2011/10/29	A/HIROSHIMA-C/54/2011	<10	40	<10	<10	
2011/10/29	A/HIROSHIMA-C/55/2011	<10	80	<10	<10	
2011/11/25	A/HIROSHIMA-C/57/2011	<10	80	<10	<10	
2011/11/26	A/HIROSHIMA-C/58/2011	10	80			
2011/11/28	A/HIROSHIMA-C/59/2011	10	80			
2011/12/6	A/HIROSHIMA-C/60/2011	<10	160			
2011/12/7	A/HIROSHIMA-C/61/2011	<10	160			
2011/12/8	A/HIROSHIMA-C/62/2011	<10	160			D151D/G/N/S
2011/12/13	A/HIROSHIMA-C/65/2011	<10	320			
2011/12/16	A/HIROSHIMA-C/63/2011	<10	160			
2011/12/26	A/HIROSHIMA-C/64/2011	<10	160			
2012/1/16	A/HIROSHIMA-C/3/2012	<10	160			D151D/G
2012/1/19	A/HIROSHIMA-C/1/2012	<10	40			
2012/1/19	A/HIROSHIMA-C/2/2012	<10	160			
2012/1/26	A/HIROSHIMA-C/5/2012	<10	160			D151D/G
2012/1/29	A/HIROSHIMA-C/9/2012	<10	80			
2012/1/30	A/HIROSHIMA-C/4/2012	<10	160			
2012/1/30	A/HIROSHIMA-C/6/2012	<10	80			
2012/1/31	A/HIROSHIMA-C/7/2012	<10	80			
2012/1/31	A/HIROSHIMA-C/8/2012	<10	80			
2012/2/1	A/HIROSHIMA-C/10/2012	<10	80			
2012/2/2	B/HIROSHIMA-C/2/2012			320	10	
2012/2/7	A/HIROSHIMA-C/11/2012	<10	80			
2012/2/7	B/HIROSHIMA-C/1/2012			320	10	
2012/2/9	A/HIROSHIMA-C/15/2012	10	80			D151D/A/T/N
2012/2/10	A/HIROSHIMA-C/12/2012	10	160			
2012/2/11	A/HIROSHIMA-C/13/2012	10	160			
2012/2/11	B/HIROSHIMA-C/3/2012			20	160	
2012/2/11	B/HIROSHIMA-C/4/2012			20	160	
2012/2/13	A/HIROSHIMA-C/14/2012	10	80			
2012/2/17	A/HIROSHIMA-C/16/2012	<10	160			
2012/2/17	B/HIROSHIMA-C/5/2012			160	<10	
2012/2/21	B/HIROSHIMA-C/6/2012			160	<10	
2012/2/23	A/HIROSHIMA-C/17/2012	<10	160			
2012/2/23	A/HIROSHIMA-C/18/2012	<10	160			
2012/2/27	A/HIROSHIMA-C/19/2012	<10	320	<10	<10	
2012/2/28	A/HIROSHIMA-C/20/2012	<10	80	<10	<10	
2012/2/29	A/HIROSHIMA-C/21/2012	<10	160	<10	<10	D151D/V
2012/3/4	B/HIROSHIMA-C/7/2012	40	40	320	<10	
2012/3/15	A/HIROSHIMA-C/22/2012	<10	80			
2012/3/22	B/HIROSHIMA-C/8/2012			160	<10	
2012/3/29	B/HIROSHIMA-C/9/2012			320	<10	
2012/4/2	A/HIROSHIMA-C/23/2012	<10	40			D151D/V
2012/4/25	B/HIROSHIMA-C/10/2012			160	<10	
2012/4/27	B/HIROSHIMA-C/11/2012			160	<10	

鼻汁および髄液 140 μl を QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN 製) で RNA 抽出した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit およびオリゴ d T プライマー (ライフテクノロジーズジャパン製) を使用し RNA から cDNA を合成した。マニュアルのプライマーおよび MGB プローブを用い, TaqMan Fast Advanced Master Mix (ライフテクノロジーズ

ジャパン製) を用いて Real-time PCR を行った。

#### 4 NA 遺伝子解析

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検査法と同様に RNA 抽出し, cDNA を合成した。プライマーは既報<sup>2)3)</sup> のものを使用し, PCR を行った。増幅産物を電気泳動し, 特異バンドを切り出した後, QIAquick Gel

Extraction Kit(QIAGEN 製)でゲル精製を行った。BigDye XTerminator 精製キット(ライフテクノロジーズジャパン製)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。解析ソフト(MEGA 4)でアミノ酸への変換を行い, インフルエンザ治療薬であるオセルタミビル NA 耐性遺伝子部位である, E119V, D151V, Q226H, G248R, K249E, R292K(A/H3N2 型), および R152K, D198E, I222T(B 型)<sup>3)</sup>の有無を確認した。

## 結 果

### 1 発生状況

272 人の患者のうち, ウイルス分離では 49 人, 遺伝子検査では 71 人からインフルエンザウイルスが検出された(図 1)。2011/12 シーズンでは 10 月から発生が確認され, シーズン初めは AH3 型が, 1 月の終わりごろから B 型の発生が見られた。ウイルス分離できた B 型 11 株中 Victoria 系統が 9 株と多く, 山形系統は 2 株であった。2011/12 シーズンは AH3 型と B 型の混合流行であった。過去 2 年間で大きな流行を起こした AH1pdm 型は検出されなかった。全国的にも, AH3 型が主流で, B 型は Victoria 系統の検出が多かった<sup>4)</sup>。

### 2 抗原解析(表 1)

国立感染症研究所から配布された 2011/12 シーズンキットを使用した, HI 試験の結果, インフルエンザウイルス A/H3N2 の抗血清 A/Victoria/210/2009(ホモ価 640)に対しての HI 価は 40 が 5/37 株, 80 が 15/37 株, 160 が 15/37 株, 320 が 2/37 株と 2~16 倍低く, 抗原性が少し違っていることが示唆された。Victoria 系統の B 型インフルエンザウイルスの抗血清 B/Brisbane/60/2008(ホモ価 640)に対しては HI 価 160 が 5/9 株, 320 が 4/9 株と 2~4 倍低い値であり, 山形系統の B 型インフルエンザウイルスの B/Bangladesh/3333/2007(ホモ価 640)に対しては HI 価 160 が 2/2 株と 4 倍低い値であった。

### 3 NA 遺伝子解析(表 1)

B 型からは耐性遺伝子変異は認められなかった。A/H3N2 型は 37 株中 151 番目のアミノ酸を構成する塩基がミックスとなっているものが 6 株検出さ

れた。アミノ酸に変換した場合, D151D/G が 2 株, D151D/V が 2 株, D151D/G/N/S が 1 株, D151D/A/T/N が 1 株であった。151 番目のアミノ酸以外の耐性遺伝子変異はみられなかった。

これらの結果から, A/H3N2 型の 151 番目のアミノ酸は変異しやすく, 今後継代されていく過程で, 完全な耐性遺伝子を獲得していく可能性もあると考えられた。今回の調査結果と同様に, 151 番目のアミノ酸が D(アスパラギン酸)ではなく, 他のいくつかのアミノ酸に変異している報告がある<sup>5)6)</sup>。D151 のアミノ酸変異の IC<sub>50</sub> は高くないものの, 変異を起こす何らかのプレッシャーがかかっていることが考えられ, 今後も解析を続けていくことが必要であると考えられる。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所:インフルエンザ診断マニュアル, 病原体検出マニュアル
- 2) 長島真美 他:季節性インフルエンザウイルスにおけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出(2007/08, 2008/09 シーズン), 東京都健康安全研究センター研究年報, 60, 61~66(2009)
- 3) 長島真美 他:インフルエンザウイルスにおけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出(2010-2011 シーズン), 東京都健康安全研究センター研究年報, 62, 57~63(2011)
- 4) 国立感染症研究所:インフルエンザウイルス分離・検出速報 2011/12 シーズン, IASR
- 5) J. McKimm-Breschkin et al:Neuraminidase Sequence Analysis and Susceptibilities of Influenza Virus Clinical Isolates to Zanamivir and Oseltamivir, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7(47), 2264 ~ 2272(2003)
- 6) Tiffany G. Sheu et al:Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 9(52), 3284~3292(2008)