

III. 協力研究報告書

北海道におけるインフルエンザウイルスの検出状況について

研究協力者 北海道立衛生研究所 駒込 理佳、三好 正浩、長野 秀樹

研究要旨

北海道におけるインフルエンザウイルスの検出状況は、直近3シーズンではAH3 亜型が流行の中心で、AH1pdm09 亜型は2011年以降ほとんど検出されなかった。B型は各シーズン後半に検出される傾向を示していた。この間、抗原変異株の割合には顕著な変化は認められなかった。

国立感染症研究所で開発されたオセルタミビル耐性検出系について、2009/10 シーズンに北海道で分離されたウイルス株を用いて実地検証を行い、その有効性を確認した。また、本検出系を用いて2010/11シーズンの分離株よりオセルタミビル耐性株を2株検出した。

A. 研究目的

インフルエンザは主に冬期に流行するウイルス性呼吸器感染症であり、インフルエンザウイルスの亜型や抗原性の変化、薬剤耐性の有無を把握することは治療及び予防方針に関する基礎的情報として重要である。したがって、ウイルスの性状を総合的に解析するための病原体サーベイランスが必要である。そこで今回、北海道における2010/11シーズンから2012/13シーズンまでのインフルエンザウイルスサーベイランスの結果について報告する。さらに、薬剤耐性ウイルス検出用のリアルタイム RT-PCR 法について、北海道で分離したウイルス株を用いて検証を行ったので、あわせて報告する。

B. 研究方法

インフルエンザ疑い患者の咽頭拭い液または鼻汁から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によって型別を行った。また、ウイルス遺伝子陽性検体から分離したウイルスについて、HI 試験により抗原性の解析を行った。

AH1pdm09 亜型の HA 遺伝子および AH3 亜型の HA1 遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析を実施した。また、2009/10 シーズンに北

海道で分離されたウイルス株について、国立感染症研究所で開発された、AH1pdm09 亜型のオセルタミビル耐性遺伝子変異検出用のリアルタイム RT-PCR 法を実施し、NA 遺伝子の塩基配列を用いて検証した。AH3 亜型については NA 遺伝子のダイレクトシーケンスによりオセルタミビル耐性変異の有無を解析した。

C. 研究結果および考察

1) 各亜型の検出状況

北海道では、2010/11 シーズンは201件、2011/12 シーズンは84件、2012/13 シーズンは25件（2013年1月まで）のインフルエンザ疑い患者の検体が搬入された。RT-PCR によってインフルエンザウイルス遺伝子が陽性だったのは、それぞれ185件、74件、25件であった。各シーズンの月別亜型検出件数を図1に示した。2010/11 シーズンの9月から12月までは AH3 亜型のみが検出され、1月及び2月は AH1pdm09 亜型が主に検出された。B型はシーズン後半の3月に多く検出された。このシーズンに分離された B 型14株は全てビクトリア系統であった。2011/12 シーズンの AH3 亜型は2011年12月から翌年3月まで、B型は2012年1月から4月まで検出された。

このシーズンに分離された B 型はビクトリア系統 10 株、山形系統 5 株で、北海道における山形系統の分離は 2008 年 1 月以来のことであった。AH1pdm09 亜型は検出されなかった。2012/13 シーズンは、2012 年 12 月に AH1pdm09 亜型が 2 件検出されたが、AH3 亜型が 12 月に 5 件、1 月に 18 件検出されており、前シーズンに引き続き本亜型が大半を占めている。昨シーズン 4 年ぶりに検出された山形系統が今シーズン後半に再び流行するかどうか注目される。

2) HA 遺伝子の系統樹解析

AH1pdm09 亜型の HA 遺伝子の系統樹を図 2 に示した。2010/11 シーズン分離株は S185T、A197T、S451N のアミノ酸置換を有しておりクレード 7 に属していた。2012/13 シーズンの臨床検体 2 件は HA 遺伝子の塩基配列が 100% 一致しており、S84G、K163I、V520A のアミノ酸置換を有し、クレード 7 に属していた。

AH3 亜型に関しては、図 3 に示したように 2010/11 シーズンは Perth/16 クレードと Victoria/208 クレードに属するウイルスが分離された。2011/12 シーズンでは Victoria/208 クレードに属する株のみが分離されており、サブクレード 3 B (A198S、N145S) 及び 2012 年度のワクチン株 A/Victoria/361/2011 を含むサブクレード 3C (A198S、S45N、T48I) に属する株に大別された。2012/13 シーズンはサブクレード 3C に属し N145S のアミノ酸置換を持つウイルスが分離されている。

3) 抗原性解析

HI 試験による抗原性解析で 8 倍以上の HI 価の相違が認められた株の割合は、AH1pdm09 亜型は 14% (2010/11 シーズン) であった。AH3 亜型については、2010/11 シーズンが 14%、2011/12 シーズンが 12% であったが、2012/13 シーズンは 1 月までの時点で 0% である。B 型の場合は、2010/11 シーズンは 21% が変異株で、2011/12 シーズンはビクトリア系統の 10% が変異株であったが山形系統は全てワクチン類似株であった。

4) 薬剤耐性ウイルスサーベイランス

国立感染症研究所で開発された H275Y オセルタミビル耐性 AH1pdm09 亜型検出用のリア

ルタイム RT-PCR 法の検証を行った。北海道で 2009/10 シーズンに分離され、NA 遺伝子解析済みの AH1pdm09 亜型 286 株について、リアルタイム RT-PCR のプライマーおよびプローブ部位に変異を持つ株が存在するかどうかを検索した (図 4)。その結果、H275 の感受性株の中に、FW プライマーに異なる変異を持つ株が 1 株ずつ、RV プライマーに同じ変異を持つ株が 3 株、プローブ部位に変異を持つ株が 1 株存在していた。これら 6 株と、Y275 変異を持つオセルタミビル耐性株 1 株、プローブおよびプライマー部位に変異を持たない H275 の感受性株 169 株の計 176 株についてリアルタイム RT-PCR を実施した。

この検出系において、H275 の感受性株に結合するプローブは VIC で標識され、Y275 変異を持つ耐性株に結合するプローブは FAM で標識されているため、これら 2 波長のシグナルを PCR 終了後に測定してプロットすると、H275 は y 軸側、Y275 は x 軸側に近い位置にプロットされる。図 5 に示すように、プライマー部位に変異を持つ 5 株については y 軸側にプロットされたので、正しく H275 と判別できた。しかし、プローブ部位に変異を持つ株はほぼ原点に近い位置にプロットされたため判定ができなかった。プライマーおよびプローブに変異を持たない H275 の感受性株 169 株、Y275 変異を持つ耐性株 1 株については、図 6 に示すようにそれぞれ正しく判定することができた。従って、1 株の判定不能検体を除いて、NA 遺伝子のシーケンスの結果とリアルタイム RT-PCR の結果は一致した。2010/11 シーズンの AH1pdm09 亜型 63 株についてこの検出系により Y275 変異の有無の解析を行ったところ、2 株が陽性となった。NA 遺伝子のシーケンスでも Y275 変異が確認され、国立感染症研究所で実施された薬剤感受性試験によっても、オセルタミビル耐性であることが確認された。このことから、本検出系によるスクリーニング試験の実用性が改めて実証された。この 2 株は NA 遺伝子も HA 遺伝子もそれぞれ異なる株であったので、散発的な発生であったと考えられた。2012/13 シーズンの AH1pdm09 亜型陽性検体 2 件の NA 遺伝子の塩基配列解析では耐性変異

は検出されなかった。AH3 亜型ウイルスは、2010/11 シーズン7株、2011/12 シーズン 10株、2012/13 シーズン6株の NA 遺伝子配列を解析したが、耐性変異は認められなかった。

D. 結論

北海道において実施されたインフルエンザウイルスサーベイランスにより、ほとんどのウイルス株がワクチン類似株であり、薬剤耐性ウイルスの検出割合に顕著な増加は認められないことが明らかとなった。しかし、2008/9 シーズンのオセルタミビル耐性ウイルスや 2009/10 シーズンの AH1pdm09 亜型ウイルスのように、それまでほとんど検出されていなかったウイルスが急速に流行を拡大する危険性は常に存在する。今後も注意深く亜型や抗原性の変化、薬剤耐性の有無についてウ

イルスサーベイランスを継続することが肝要である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 駒込理佳、井上真紀、長野秀樹、工藤伸一、岡野素彦. 北海道におけるパンデミック (H1N1)2009 インフルエンザについてー 2009/10 シーズンー 北海道立衛生研究所報 60 : 57-60, 2010.

2) 駒込理佳、三好正浩、長野秀樹、岡野素彦. 北海道におけるインフルエンザウイルスの検出状況 北海道立衛生研究所報 61 : 25-27, 2011.

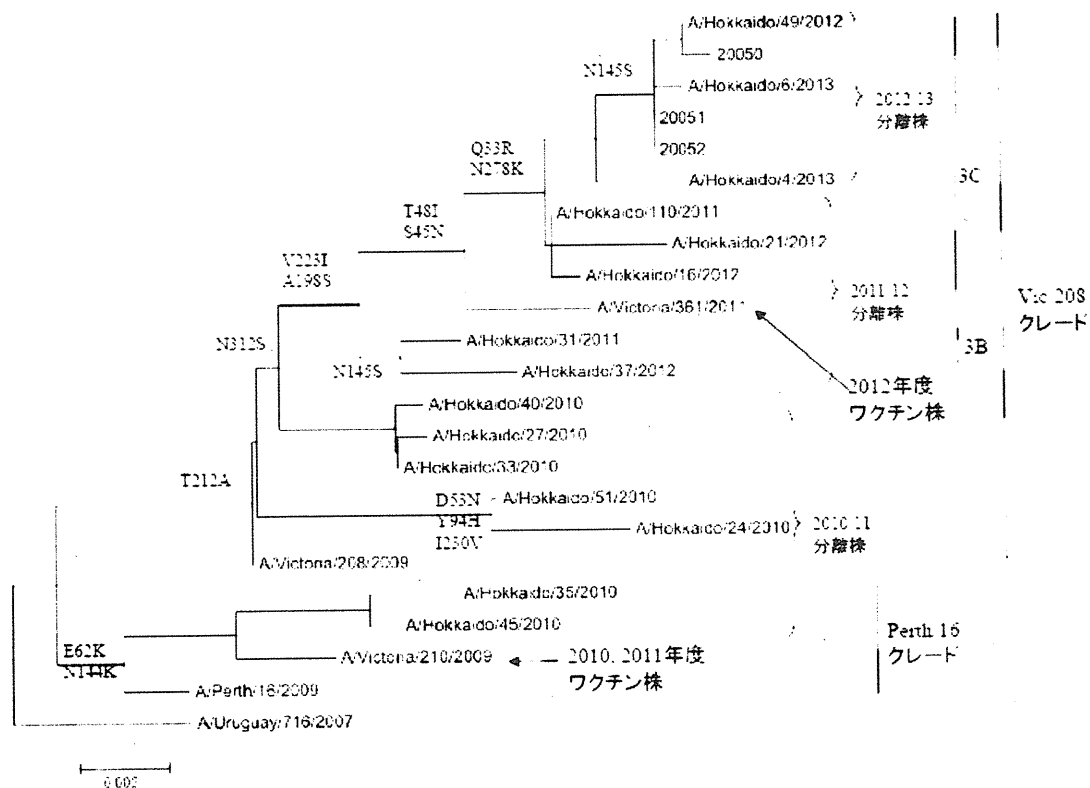


図3 AH3 亜型ウイルス HA1 遺伝子系統樹解析

FW primer (C714T, T717C)

ATGTGCATGTGTA^AATGGTTCTTGITTTAC 1株
 ATGTGCATGTGTA^AATGGTTCTTGCTTCAC 1株

RV primer (A867T)

CCTGATTCTAGTGA^AATCACITGTGT 3株

probe (G831A)

CACTATGAAGAAT 1株

図4 リアルタイム RT-PCR のプライマーおよびプローブ結合部位に存在した NA 遺伝子変異

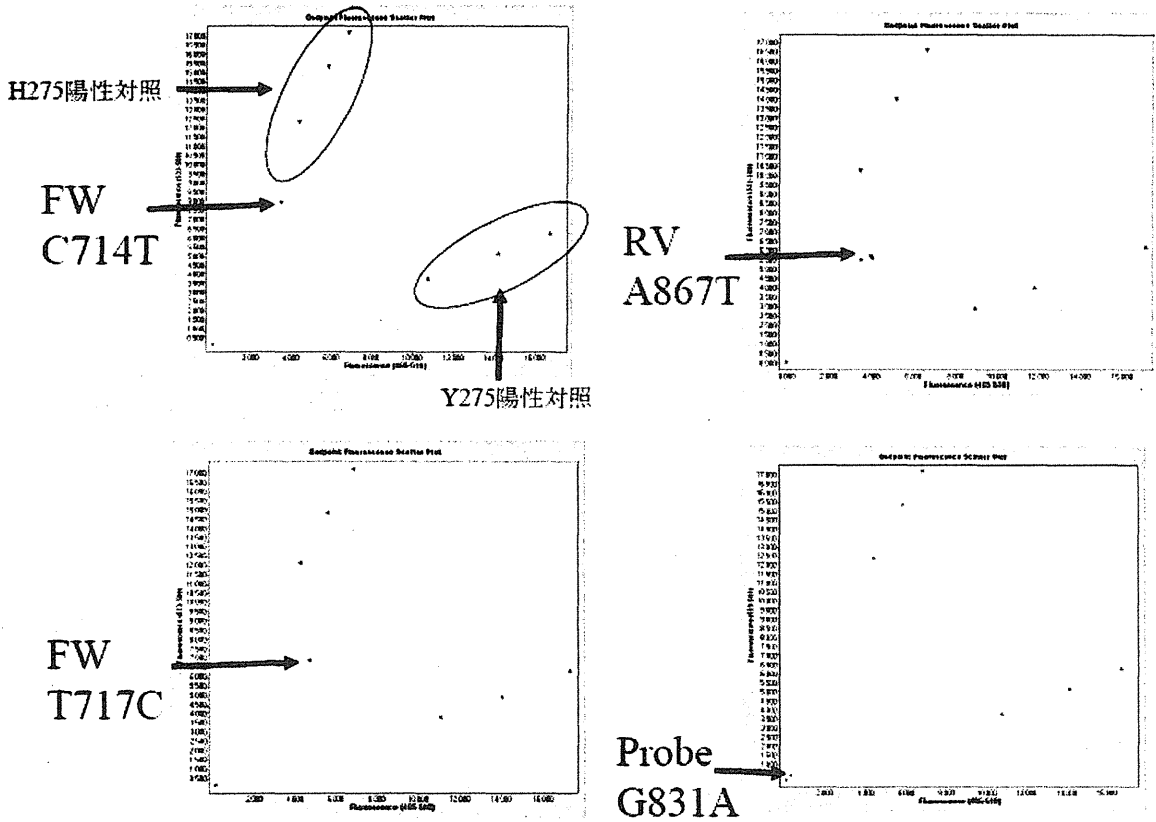


図5 プライマーまたはプローブに結合する部位に変異を有する株のリアルタイム RT-PCR

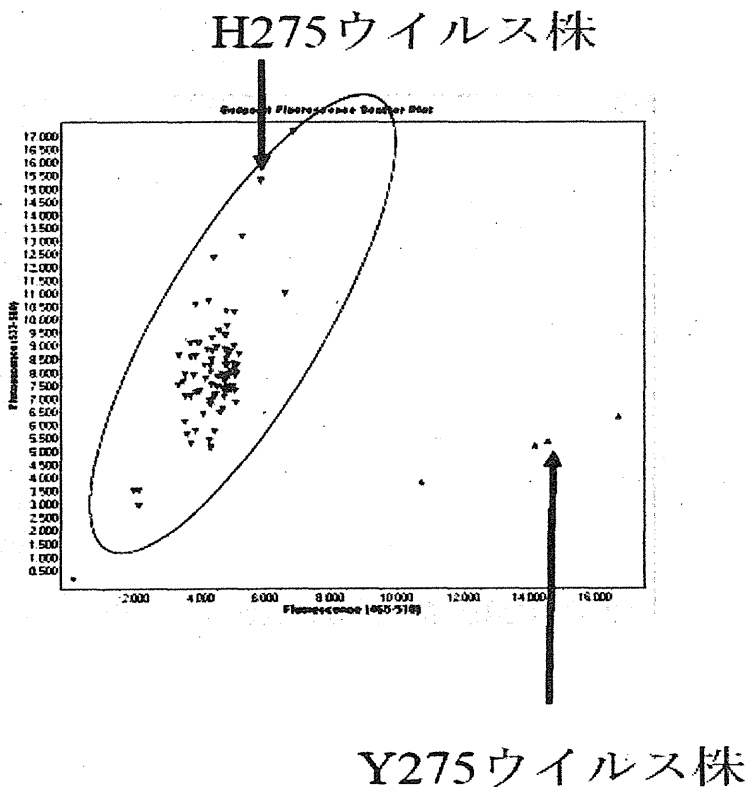


図6 2009/10 シーズン分離株のリアルタイム RT-PCR

東京都におけるインフルエンザウイルス検出法の検討と抗インフルエンザ薬に対する耐性遺伝子変異の獲得状況について

研究協力者 東京都健康安全研究センター 新開敬行 長島真美 林 志直

研究要旨

東京都におけるインフルエンザウイルス検査の迅速性ならびに検査精度の向上のために、

1.検査法の開発として、A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの検査法、A型ウイルスの検査法を新たに作成し、A/H3N2 亜型およびB型の検査法の見直しを行い、流行株のウイルスを効率的に検出できるようにした。また、薬剤耐性マーカー遺伝子の検出法としてリアルタイムPCR法による検査法を開発し、2009/2010年シーズンに分離されたウイルスの検査を行った。2.抗インフルエンザ薬に対する耐性遺伝子変異の検出として、東京都で分離されたインフルエンザウイルスの薬剤耐性遺伝子として報告されている領域を調査した。

A 研究目的

東京都において発生するインフルエンザウイルスの検出には、遺伝子検査、血清学的検査、分離培養検査が用いられている。この内、迅速性が最も高い遺伝子検査は、発生から短時間で結果を得ることが出来るため、患者発生後の感染拡大等を防止するために臨床や行政の場において重要な情報源となるものである。しかし、インフルエンザウイルスは毎年、微小な変異を繰り返しており、遺伝子変異やワクチン抗原との乖離等に対する対策は尽きないのが実状である。これらのインフルエンザウイルスを効率よく検出することを目的として遺伝子検出法を中心とした検討と改良を行なってきたのでその概要を報告する。

B 研究方法

1. 検査法の開発

ア) インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09) の検出法の開発と流行株における抗原解析

A/H1N1pdm09 亜型ウイルスが東京都で流行する前にWHOにより公開された遺伝子配列を基に、A/H1N1pdm09 亜型ウイルスのHA遺伝子を検出するリアルタイムPCR法とRT-nested PCR法およびA型インフルエンザウイルスのNP遺伝子を検出するリアルタイムPCR法とRT-nested PCR法を開発し検査体制を構築した。2009/2010/2011シーズン中に都内で流行したA/H1N1pdm09 亜型ウイルスのHA遺伝子配列の解析を行った結果、4つの大きなグループに分かれたが、その後、徐々に少数のグループに収束する傾向が明らかになった。

イ) A/H3N2 亜型およびB型インフルエンザウイルスのHA遺伝子変異への対応

A/H3N2 亜型およびB型ウイルスは、HA遺伝子上のプライマー接合領域等での変異により検出感度が低下したり、シーケンスによる遺伝子配列の確認が困難になることがあった。流行シーズン前に検査試薬の変更・確認を行い微小な変異に対応できるプライ

マーの修正を行ってきたが、近年、流行シーズン中に変異がみられる例が増加しており、RT-nested PCR 法やリアルタイム PCR 法で使用するプライマーおよびプローブの再点検を行った。その結果、下流側プライマーに最大8塩基(24塩基中)の不一致例がみられたことから、プライマーの更新を行い、変異した流行株の配列に対応した。

ウ) リアルタイム PCR 法を用いた A/H1N1pdm09 亜型ウイルスにおける薬剤耐性マーカー遺伝子の検出

オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスのサーベイランス調査に使用するために、A/H1N1pdm09 亜型ウイルスの耐性変異の有無を NA タンパク質の 275 位のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換 (H275Y) されたアミノ酸変異を検出する RT-nested PCR 法—シーケンス法およびリアルタイム PCR 法を用いた方法を独自に開発した。

2. 抗インフルエンザ薬に対する耐性遺伝子変異の検出

ア) 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)

インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異を調査する目的で、新たに A/H3N2 亜型 (E119V) および B 型 (R152K) 変異検出用のリアルタイム PCR 法を開発した。先に開発した A/H1N1pdm09 亜型のオセルタミビル耐性変異の検出法を併用して、2010/2011 年シーズンに都内で分離された A/H1N1pdm09 亜型 (151 株)、A/H3N2 亜型 (75 株) および B 型 (55 株) を調査したところ、A/H1N1pdm09 亜型 2 株に H275Y のアミノ酸変異が認められた。

イ) 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 (2011/2012 年シーズン)

抗インフルエンザ薬耐性変異は、A/H1N1

および A/H1N1pdm09 亜型インフルエンザウイルスで過去に都内でも認められており、A/H3N2 亜型並びに B 型ウイルスについても薬剤耐性変異を獲得したウイルスによる流行が懸念されている。

本研究では、2011/2012 年シーズンにインフルエンザ定点医療機関より当センターに搬入されたインフルエンザ患者検体から分離されたインフルエンザウイルス株を用いて、ノイラミニダーゼ領域の遺伝子解析を行い、オセルタミビル耐性遺伝子変異を検索した。2011/2012 シーズンは A/H3N2 亜型、B 型の流行であったことから、それぞれ 79 株、111 株について遺伝子検索を行った結果、耐性変異を持ったウイルス株は認められなかった。

C 研究結果と考察

1. 検査法の開発

ア) A/H1N1pdm09 亜型株の検出法は、他のインフルエンザウイルス感染症を含めた症例も対象とした 8 項目のスクリーニング検査システムとして構築した。開発したリアルタイム PCR 法のプライマー/プローブは、A/California/04/2009 株のみならず、A/Hsw/NJ/1976 (H1N1) 株等のブタインフルエンザウイルス HA 遺伝子配列についても確実に検出できるように配列を設計し、当センターで保有していた A/Hsw/NJ/08/1976 株から抽出した RNA を使用して実際に確認することで、新型インフルエンザウイルスの遺伝子検出の信頼性を飛躍的に高めることが出来た。また、A 型共通配列を検出するプライマー/プローブの動作確認には、当センターで保有していた A 型 6 種類の各亜型 RNA を使用した。その結果、元の抗原液の濃度調整を行っていなかったため抽出された RNA 量にばらつきがあったものの、リアルタイム PCR 法による検出では、19 サイクルから 23 サイクルまでの比較的早いサイクルで、6 種類の A 亜型 RNA が検出されたことから、A

型インフルエンザウイルスを検出に有効であることが推察された。また、今回開発したプライマーと国のプライマー (SW1-R, NIID-swH1- TaqMan-F1) を用いたRT-PCR法によるHA 遺伝子の増幅領域は702 塩基長になり、感染研のRT-PCR 法による増幅領域の2 倍程長いのが特徴である。さらに、この領域内に2 つの異なったnested PCR 増幅領域 (384bp, 350bp) を確保したことで、検出および確認手段としての遺伝子検出法を整備することが出来た。

イ) A/H3N2 亜型, B 型ウイルスは、2011/2012年シーズンならびに2012/2013年シーズン中である1月中旬にそれぞれHA 遺伝子での変異が見られたことから、遺伝子増幅に使用しているプライマーの配列を流行株の配列を参考に變更して、従来から使用しているプライマーと混合して流行株の検出に用いた。その結果、遺伝子配列の變更が見られた前後での検出率や検出感度が回復し、検査への障害が終息した。新しく作成したプライマーは分注して保存後、従来品であるプライマーと混合して検査に用いている。

ウ)リアルタイム PCR法の検出感度について、10倍段階希釈した標準DNAを用いて検討した結果、H275H検出用およびH275Y 検出用とも 9.0×10^2 copies/tube から 9.0×10^6 copies/tubeの範囲内において、サイクル数に比例しDNA量の増幅曲線が得られ、検出感度はともに 9.0×10^2 copies/tubeと推定された。2009/2010年シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm09株のうち、RT-nested PCR法—シーケンス法でH275Yのアミノ酸変異がみられた1株を含むA/H1N1pdm09亜型116株についてリアルタイム PCR法を用いて薬剤耐性変異の検出を行い、薬剤耐性変異の有無を判定した。その結果、感受性株115株はすべてH275Hの感受性株に、耐性変異株1株はH275Y耐性株と判定され、系統樹解析による

結果と一致した。この方法を用いて2009/2010年シーズンに東京都で分離されたA/H1N1pdm09亜型546株を調査したところ、1株にH275Yのアミノ酸変異がみられた。

2. 抗インフルエンザ薬に対する耐性遺伝子変異の検出

ア)リアルタイム PCR 法を用いたA/H1N1pdm09 亜型ウイルスにおける薬剤耐性マーカー遺伝子の検出では、2010/2011年シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm09 亜型 151 株についてリアルタイム PCR 法を用いて薬剤耐性変異の検出を行い、薬剤耐性変異の有無を判定した。その結果、H275H: 149 株 (98.7%), H275Y: 2 株 (1.3%) であった。また、151 株のうち58 株について、RT-nested PCR 法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調査したところ、解析した58 株のうちリアルタイム PCR 法でH275Y と判定された2 株にH275Y の変異が確認されたが、I223R/V, N295S の変異は認められなかった。また、A/H3N2 型75 株についてリアルタイム PCR 法を用いて薬剤耐性変異の検出を行ったところ全てE119E で変異は認められなかった。さらに、この内46 株について、RT-nested-PCR 法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調査したところ、46 株すべてでアミノ酸変異は認められなかったが、D151A が1 株、D151E が1 株、D151G が2 株、D151N が2 株あった。

B 型55 株についてリアルタイム PCR 法を用いて薬剤耐性変異の検出を行ったところ、55 株すべてがR152R で変異は見られなかった。この内23 株について、RT-nested-PCR 法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調査したところ、23 株のすべてでアミノ酸変異は認められなかった

リアルタイム PCR 法を用いた薬剤耐性変

異の検出は一度に多数検体の検出が可能であり、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析による薬剤耐性変異の検出よりも短時間で解析することができる。一方で、対象となる耐性変異の有無の判定しかできないため、新たな薬剤耐性変異部位が出現した場合には、改めて検出系の開発が必要となる。

イ) 2011/2012 シーズンに都内で分離された A/H3N2 亜型 79 株について、薬剤耐性変異の有無について調査した。その結果、79 株全てでオセルタミビル耐性に関与する領域である E119V, D151V, Q226H, G248R, K249E, R292K のアミノ酸変異は認められなかったが、151 位のアミノ酸が数種に変異しており、D151A が 1 株、D151E が 1 株、D151G が 11 株、D151N が 24 株認められた。151 位について 2010/2011 年シーズンと比較すると、グリシン (G) に変異している株が 2 株から 11 株 (5.5 倍)、アスパラギン (N) に変異している株は 2 株から 24 株 (12 倍) に変異株の数が増えていた。また、B 型 111 株について、アミノ酸配列の解析を行い、薬剤耐性変異の有無について調査した結果、111 株全てに R152K, D198E, I222T のアミノ酸変異は認められなかった。

D 結論

新型インフルエンザ検査に対応したリアルタイムPCR法およびRT-nested PCR法を開発した。

A型共通配列を検出するプライマー、プローブは、6種類のA型インフルエンザウイルス (H1N1, H1N2, H3N2, H5N1, H7N3, H9N2) RNA を全て検出したことで新型および鳥インフルエンザウイルスの補助的検出系として使用可能であると推察された。新型インフルエンザ検査に対応したRT-nested PCR法は、感度と特異性が高く、リアルタイムPCR法により判定保留となった検体の確認に使用することができた。

A/H3N2 亜型、B 型に発生している遺伝子変異は、発生する領域によって検出用のプライマー等に影響がでるため、流行シーズン中であってもシーケンス等による配列の確認が必要である。また、流行株を効率よく捉えられるようにプライマー等の配列を定期的に見直す必要がある。

オセルタミビル耐性遺伝子変異の検出法を開発し、2009/2010 年シーズンに東京都内で分離された A/H1N1pdm09 亜型 1 株に H275Y アミノ酸変異が認められた。real-time PCR 法を用いて、H275Y のアミノ酸変異がみられた 1 株を含む A/H1N1pdm09 亜型 116 株のアミノ酸耐性変異を調査したところ、感受性株 115 株はすべて感受性株と判定され、耐性変異株 1 株は耐性株と判定された。インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異 (A/H3N2 亜型: E119V, B 型 R152K) の検出法を開発した。先に開発した A/H1N1pdm09 亜型の検出法を加えて、2010/2011 年シーズンに都内で分離されたインフルエンザウイルス 281 株を調査したところ、A/H1N1pdm09 亜型 2 株に H275Y のアミノ酸変異がみられた。

2011/2012 シーズンにウイルス分離された、インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異の調査を行った。今シーズンに分離されたウイルスは A/H3N2 亜型 79 株、B 型 111 株であった。全ての株でオセルタミビル耐性変異は認められなかった。

E 研究発表

1. 論文発表

- 1) 新開 敬行, 長島 真美, 吉田 勲, 原田 幸子, 尾形 和恵 他 3 名, インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09) の検出法の開発と流行株における抗原解析. 東京都健康安全研究センター研究年報 62: 49-55, 2011
- 2) 長島 真美, 新開 敬行, 原田 幸子 他 9 名, 新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm09 におけるオセルタミビル耐性

遺伝子変異の検出. 東京都健康安全研究センター研究年報 61: 121-126, 2010

3) 長島 真美, 新開 敬行, 原田 幸子, 吉田 勲, 尾形 和恵 他 4 名, 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) 原田 幸子, 新開 敬行, 長島 真美, 吉田 勲, 尾形 和恵 他3名, 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 (2011/2012シーズン). 東京都健康安全研究センター研究年報 63: 901-906, 2012

2. 学会発表

1) 吉田勲, 塚本良治, 原田幸子, 新開敬行 他 4 名 新型インフルエンザウイルスの迅速診断キットによる検出感度の比較 第 25 回関東甲信静支部ウイルス研究部会 神奈川県横浜市 2010 年 10 月

2) 原田幸子, 新開敬行, 吉田勲, 長島真美, 林志直 他 3 名 東京都内における低凝集性インフルエンザ A/H1N1pdm09 ウイルス株の浸淫状況 第 26 回関東甲信静支部ウイルス研究部会 静岡県静岡市 2011 年 9 月

3) 原田幸子, 新開敬行, 吉田勲, 長島真美, 尾形和恵, 林志直, 甲斐明美 低凝集性インフルエンザウイルスのヘマグルチニンアミノ酸変異について 日本進化学会第 14 回東

京大会 東京都 2012 年 8 月

4) 吉田勲, 新開敬行, 原田幸子, 長島真美, 林志直 他 4 名 2011-2012 シーズンの A 型インフルエンザウイルスの分離について 第 27 回関東甲信静支部ウイルス研究部会, 山梨県甲府市 2012 年 9 月

F 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし.

2. 実用新案登録

なし.

3. その他

横浜市におけるインフルエンザウイルスの解析

研究協力者 横浜市衛生研究所 川上 千春

研究要旨

3シーズンの横浜市で分離されたウイルスについて、以下のウイルス解析を行った。

1. 分離株のHA系統樹解析

AH1N1pdm09ウイルスはクレード7に属するウイルスが大半を占め、他にもクレード3、5、8に属するウイルスが分離された。AH3N2ウイルスはPaeth/16クレードからVictoria/208クレード5、3B、3Cへ移行した。B型ウイルスはVictoria系統のTaiwan/55クレードとBrisbane/60クレードの1Aおよび1Bが混合していたが、翌シーズンには山形系統のクレード2とクレード3の混合流行となり、2012/2013シーズンは山形系統のクレード2が分離された。

2. NA阻害剤に対する耐性株の解析

2010/2011シーズンに3株のAH1N1pdm09ウイルスH275Y変異株と1株のAH3N2ウイルスR292K変異株が検出された。このうち、AH1N1pdm09ウイルスの1株は2010年に承認された新薬のペラミビル単独投与による初めての国内症例であった。

3. 病原性に関与する内部遺伝子の解析

A型インフルエンザのPB1、PB2、NS遺伝子について、病原性に関与するアミノ酸配列を検索した。AH1N1pdm09ウイルスは2009年の出現時から大きな変異はみられなかった。PB2遺伝子ではAH3N2ウイルスは依然として感染力の増強にかかわるアミノ酸がみられた。

4. 糞便由来検体の分離・検出の試み

3シーズンの102検体の糞便由来検体についてインフルエンザウイルス検索を行い、Victoria系統のB型ウイルスとAH3N2ウイルスを分離した。

5. 薬剤投与後長期間排泄されたAH3N2ウイルスの解析

オセルタミビルの予防内服およびペラミビルの2回投与後、2ヶ月間にわたりウイルス検出が持続していたが、ペラミビル投与後1ヶ月目の検査では耐性変異はみられず、塩基置換がみられたのはHA、M、NP遺伝子における1塩基置換のみであった。

A. 研究目的

地方衛生研究所はインフルエンザ流行を把握する第一線としてスクリーニング検査を担っている。変異株や耐性株についての情報を感染研に報告し、ウイルス株を提供するとともに、地域に情報を還元すること

も重要であり、特に薬剤耐性に関しては、治療方針への選択に迅速な結果が望まれ

ている。本研究では2010/2011シーズンから3シーズンに分離されたウイルスについて、以下のウイルス解析を行った。

1. 分離株のHA系統樹解析
2. NA阻害剤に対する耐性株の解析
3. 病原性に関与する内部遺伝子の解析
4. 糞便由来検体の分離・検出の試み
5. 薬剤投与後長期間排泄されたAH3N2ウイルスの解析

B. 研究方法

1. 分離株の HA 系統樹解析

定点医療機関、集団かぜ調査、入院サーベイランスで分離したインフルエンザウイルス分離株の代表株について HA シークエンスを行い、Neighbor-joining 法(以下 NJ)により系統樹解析を行った。

2. NA 阻害剤に対する耐性株の解析

AH1N1pdm09 ウイルスについては TaqMan-リアルタイム PCR 法を用いた H275Y 耐性株の検出法で、AH3N2 ウイルスについては NA 遺伝子の部分シークエンス法で塩基配列を決定し、耐性に関するアミノ酸配列を検索した。

3. 病原性に関する内部遺伝子の解析

A 型インフルエンザについては重症例、入院例、NA 耐性事例を中心に PB1、PB2、NS 遺伝子をシークエンスし、病原性に関するアミノ酸配列を検索した。

4. 糞便由来検体の分離・検出の試み

2009 年のパンデミック流行時に、糞便由来検体より AH1N1pdm09 ウイルスを分離したことから、継続して分離培養を試みた。また、インフルエンザシーズンに入った 11 月から 5 月までの糞便由来検体については、リアルタイム PCR 法と LAMP 法による遺伝子検出も行った。

5. 薬剤投与後異なる採取日に分離した同一患者からのウイルス 3 株について、HA 遺伝子および NA 遺伝子の塩基配列を決定し、NJ 系統樹解析を行った。NA および M 遺伝子については既知の耐性マーカーの検索を行った。薬剤感受性試験は蛍光法 (MUNANA 基質) を用いて、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビルに対する 50%阻害濃度 (IC50) を測定した (感染研との共同研究)。その他内部遺伝子について変異の有無と病原性に関するアミノ酸置換を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究においては、感染症発生動向調査事業および行政依頼検査に基づいて搬入された検体を用いており、倫理面への対応は個人情報保護等に十分配慮して実施した。

C. 研究結果

2010/2011 シーズン以降 3 シーズンのインフルエンザウイルス分離・検出数を表 1 に示す。

1. 分離株の系統樹解析

AH1N1pdm09 ウイルスは 2010/2011 シーズンに流行がみられ、系統樹解析では S185T、A197T、E374K、S451N のアミノ酸置換したクレード 7 が主流となった。他にもクレード 3、5、8 に属するウイルスが分離された。2011/2012 シーズンは分離されなかったが、2012/2013 シーズンは輸入例と散发例からクレード 7 に属するウイルスが分離され、S143G のアミノ酸置換したグループであった (図 1)。

AH3N2 ウイルスは 2010/2011 シーズンは Perth/16 クレードに属する株よりも T212A に置換した Victoria/208 クレードに属する株が多くみられた。2011/2012 シーズンは N312S、A198S、V223I にアミノ酸が置換したサブクレード 3B と S45N、T48I、Q33R、S278K に置換したサブクレード 3C がほぼ同等に分離された。2012/2013 シーズンの分離株はサブクレード 3C であり、さらに N145S のアミノ酸置換がみられた (図 2)。

B 型ウイルスは 2010/2011 シーズンに Victoria 系統のウイルスが分離されたが、その中でも Taiwan/55 クレードに属するウイルスが多かった。2011/2012 シーズンは Victoria 系統と山形系統の混合流行となり、その比率は 6 : 4 であった。山形系統のウイルスは S150I、N165Y、G229D のアミノ酸置換が共通のクレード 3 と R48K、T181A のアミノ酸置換が共通のクレード 2 に別れた。2012/2013 シーズンは山形系統のウイルスが分離され、クレード 2 に属していた (図 3)。

2. NA 阻害剤に対する耐性株の解析

2010/2011 シーズンはリアルタイム PCR 法の検査導入にともない、迅速に耐性株のスクリーニングが実施でき、重症・入院サーベイランスで分離した 2 株と集団調査で分離した 1 株の AH1N1pdm09 ウイルスで H275Y 変異株が検出された (図 4)。

また、集団かぜ調査で分離した 1 株の AH3N2 ウイルスで、R292K に置換した株がみられた。このうち、AH1N1pdm09 ウイルスの 1 株は 2010 年に承認された新薬のペラミビル単独投与による初めての国内症例であった。国立感染症研究所の薬剤感受性試験ではペラミビル耐性株はオセルタミビルに対しても交叉耐性が認められた。一方、2004/2005 シーズン以降の調査ではじめて検出された AH3N2 ウイルスの R292K 変異株は、薬剤感受性試験においてオセルタミビルに対して高度耐性を示し、他のペラミビル、ザナミビル、ラニナミビルに対しても感受性の低下がみられた (表 2)。2010/2011 シーズンの耐性株検出頻度は AH1N1pdm09 ウイルス 3.1%、AH3N2 ウイルス 1.2%であった。2011/2012 シーズンおよび 2012/2013 シーズンについては、耐性変異株は検出されず、地域での流行はみられなかった。

3. 病原性に関与する内部遺伝子の解析

AH1N1pdm09 ウイルスは PB1-F2 をコードする遺伝子が欠失しており、2010/2011 シーズンの株も同様であった。AH3N2 ウイルスは PB1-F2 蛋白を合成するアミノ酸が 90 残基の株と 52 残基の株があったが、66 番目のアミノ酸はアスパラギン (N) であった。

PB2 遺伝子では AH1N1pdm09 ウイルスは 627 番目のアミノ酸がトリ型のグルタミン酸 (E) のままで、高い温度での増殖能の性状を保持していた。しかし、ヒト細胞におけるポリメラーゼ活性が高くなるとされる 590 番目と 591 番目の SR 変異のうち、590 番目アミノ酸がアスパラギン (N) に置換した株が 8 株あった。AH3N2 ウイルスは 627 番目のアミノ酸がヒト型のリシン (K) であり、他には感染力の増強にかかわるとされるアミノ酸 (661T、667I、702R) がみられた。

NS1 遺伝子では AH1N1pdm09 ウイルスはこのモチーフが存在する C 末端のアミノ酸が欠失しており、ブタインフルエンザウイルスの性質のままであった。しかし、AH3N2 ウイルスはインターフェロン抵抗

性に関連する 92D (アスパラギン酸) をコードする遺伝子やアポトーシスに関連する PDZ ドメインに結合する C 末端モチーフ (S-X-V) を持っていた。

4. 糞便由来検体の分離・検出の試み

3 シーズンの 10 月から 5 月までの期間中に、医療機関から搬入された 102 検体の糞便由来検体についてインフルエンザウイルス検索を行い、ビクトリア系統の B 型ウイルスと AH3N2 ウイルスを分離した。遺伝子検査では AH1N1pdm09 ウイルスが 4 件、AH3N2 ウイルスが 2 件検出された (表 3)。

5. 長期持続感染例で分離した AH3N2 ウイルスの解析

HA 遺伝子では、3 回目の採取分離ウイルスで、721 番目の塩基が A から G に置換していたが、アミノ酸変異はなかった。NA 遺伝子では、3 株とも 100%の相同性を示し、既知の耐性変異は見つからなかった。また、4 種の抗インフルエンザ薬に対する IC50 値の上昇は認められず、薬剤に対する感受性を保持していた。M 遺伝子では、3 株ともアマンタジン耐性変異 (S31N) をもっていた。長期間継代されたにもかかわらず、塩基置換がみられたのは HA、M、NP 遺伝子における 1 塩基置換のみであった。

D. 考察

インフルエンザウイルスは毎シーズン変異を繰り返すことから、流行中のウイルスの性状を把握することはとても重要であり、迅速な解析が望まれている。HA 遺伝子系統解析は変異の傾向を捉えるために有効な解析法であり、国内外の株との比較が容易であることから活用している。3 シーズンの各ウイルスの動向では、毎シーズン流行を起こしている AH3N2 ウイルスは変異の進み方が早く、AH1N1pdm09 ウイルスは 2011/2012 シーズン以降大きなアミノ酸変異はみられていない。B 型ウイルスでは 2 系統のウイルスが数年置きに入れ替わっており、アミノ酸変異の多様性は A 型より少なかった。

非流行期の分離株や輸入例の分離株は次のシーズンの流行を予測する上でも参考になることから積極的なサーベイランスが有効と考える。

2007/2008 シーズンのオセルタミビル耐性季節性 AH1N1 ウイルスの出現以降、耐性株調査が全国で開始されたが、感染研が構築した H275Y 耐性マーカーの TaqMan リアルタイム PCR 法の検出は、大量の検体処理が可能となり、迅速な判定と情報を提供することができた。特に 2010/2011 シーズンに本格的な処方が始まったペラミビルの耐性株事例においては、感染研との連携のもと速報することができた。また、耐性変異株と感受性株の割合が解析できることから、薬剤による選択か耐性株の流行かを予想する上でも有用な検査法と考える。

病原性に関与する内部遺伝子については症例数を集積し、解析することが必要と考える。また、2011 年には米国でブタ由来 AH3N2v ウイルスのヒトへの感染事例もでていることから、新たなリアソータントウイルスの監視にも役立てられると思われる。

糞便由来検体からは 2009/2010 シーズンも含めると 3 種類のウイルスが分離できた。文献的にも乳幼児や小児においては分離報告があり、今回も乳幼児であった。材料としては直腸ぬぐい液が腸内容物中の細胞毒性や細菌の影響が少なく、インフルエンザウイルスを分離することができる。腸管内で増殖しているかどうかは今後の検討課題である。

免疫抑制状態の患者において、インフルエンザの罹患は現病の治療を妨げるばかりか憎悪させる可能性があり、抗インフルエンザ薬の投与は欠かせなくなっている。一方でこれらの患者では抗インフルエンザ薬の投与中に耐性ウイルスが出現しやすいとされている。本事例ではオセルタミビルの予防内服およびペラミビルの 2 回投与後、2 ヶ月間にわたりウイルス検出が持続していたが、1 ヶ月目の検査では耐性変異はみらず、各遺伝子の変

異も少なかった。治療方針に役立てられる症例の集積が大切と考える。

E. 結論

インフルエンザウイルスの解析を行うためにはウイルスを分離することが基本である。しかし、2010/2011 シーズン以降は A 型インフルエンザが分離しにくくなっている。さらに薬剤投与後の検体については厳しい状況である。感染研やコア・サポート地研で培養条件の検討を行うことも重要な課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) Kawakami C et al. Detection and isolation of Pandemic (H1N1) 2009 influenza virus from stool sample. Options for the Control of Influenza VII 香港 2010 年 9 月
- 2) 川上千春 高下恵美 森 愛 杉田繁夫 信澤枝里 シンポジウム「新型インフルエンザ H1N1 ウイルスの系統的進化と糖鎖進化のレビュー」第 24 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 長野 2010 年 7 月
- 3) 川上千春 七種美和子 豊澤隆弘 胃腸炎症状をともなう AH1pdm インフルエンザウイルスの検索. 第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会 仙台 2011 年 11 月
- 4) 川上千春 七種美和子 糞便検体から分離・検出された AH1pdm インフルエンザウイルス症例の検討. 第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 2010 年 10 月 東京
- 5) 川上千春 宇宿秀三 七種美和子 熊崎真琴 Nongluk Sriwilaijaroen 鈴木康夫 同一患者の咽頭および糞便検体から分離された AH1pdm インフルエンザウイルスの解析. 第 58 回日本ウイルス学会 11 月

- 6) Kawakami C, Takashita E, (他 7 名), Odagiri T, Tashiro M Neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses detected in the 2010/11 season in Yokohama, Japan. Congress of Virology P035-14 札幌 2011 年 9 月
- 7) 川上千春 七種美和子 豊澤隆弘 ペラミビル治療患者より検出された H275Y 耐性マーカーをもつ A/H1N1pdm インフルエンザの症例. 第 52 回日本臨床ウイルス学会
- 8) 川上千春 七種美和子 高下恵美 横浜市における A 型インフルエンザウイルスの薬剤耐性サーベイランス. 第 60 回日本感染症学会東日本地方会学術集会感染症. 山形 2011 年 10 月
- 9) 川上千春 七種美和子 豊澤隆弘 2010/2011 シーズンに横浜市で検出した抗インフルエンザ薬耐性変異ウイルス. 第 42 回日本小児感染症学会総会・学術集会 岡山 2011 年 10 月
- 10) 川上千春 百木智子 七種美和子 宇宿秀三, 岩田真美 豊澤隆弘 高下恵美 江島美穂 小田切孝人 田代眞 2010/2011 シーズンに横浜市で検出した抗インフルエンザ薬耐性ウイルス.
- 第 25 回インフルエンザ研究者交流の会 シンポジウム 富山 2011 年 6 月
- 12) 川上千春 七種美和子 高下恵美 江島美穂 長期持続感染例のウイルス変異 第 26 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 福島 2012 年 5 月
- 13) 川上千春、七種美和子、宇宿秀三、高下恵美、小田切孝人、田代眞人 免疫抑制患者において薬剤投与後持続感染がみられた A(H3N2)インフルエンザウイルスの解析 第 60 回日本ウイルス学会 大阪 2012 年 11 月
- 14) 川上千春 七種美和子 豊澤隆弘 薬剤投与後長期間排泄された AH3 型インフルエンザウイルスの変異 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 北九州 2012 年 11 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表1 横浜市における3シーズンのインフルエンザのウイルス分離および遺伝子検査結果

調査期間	検体数	陽性数	AH1pdm	AH3型	A型 (型別不明)	B型
2010年9月～2011年8月	867	316	133	108	2	73
2011年9月～2012年8月	839	265	0	183	3	79
2012年9月～2013年2月	428	129	2	123	0	4
合計	2134	710	135	414	5	156

太字アンダーライン: ワクチン株
 ★: 2010/2011シーズン分離株
 ▲: 2011/2012シーズン分離株
 ●: 2012/2013シーズン分離株

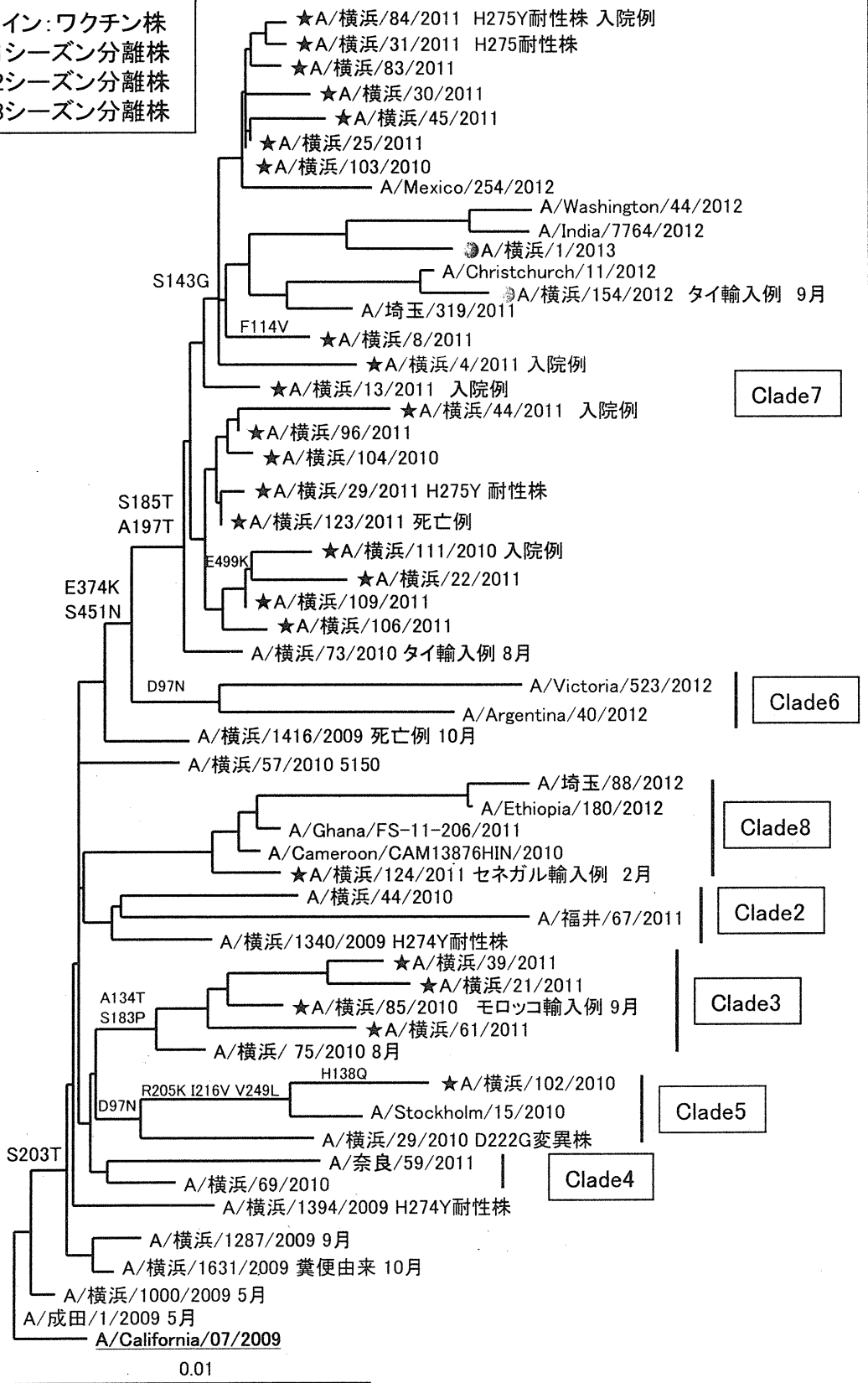


図1 AH1N1pdm09 ウイルスのHAポリペプチド (1702 b p) のNJ系統樹

太字アンダーライン: ワクチン株
 ★: 2010/2011シーズン分離株
 ▲: 2011/2012シーズン分離株
 ●: 2012/2013シーズン分離株

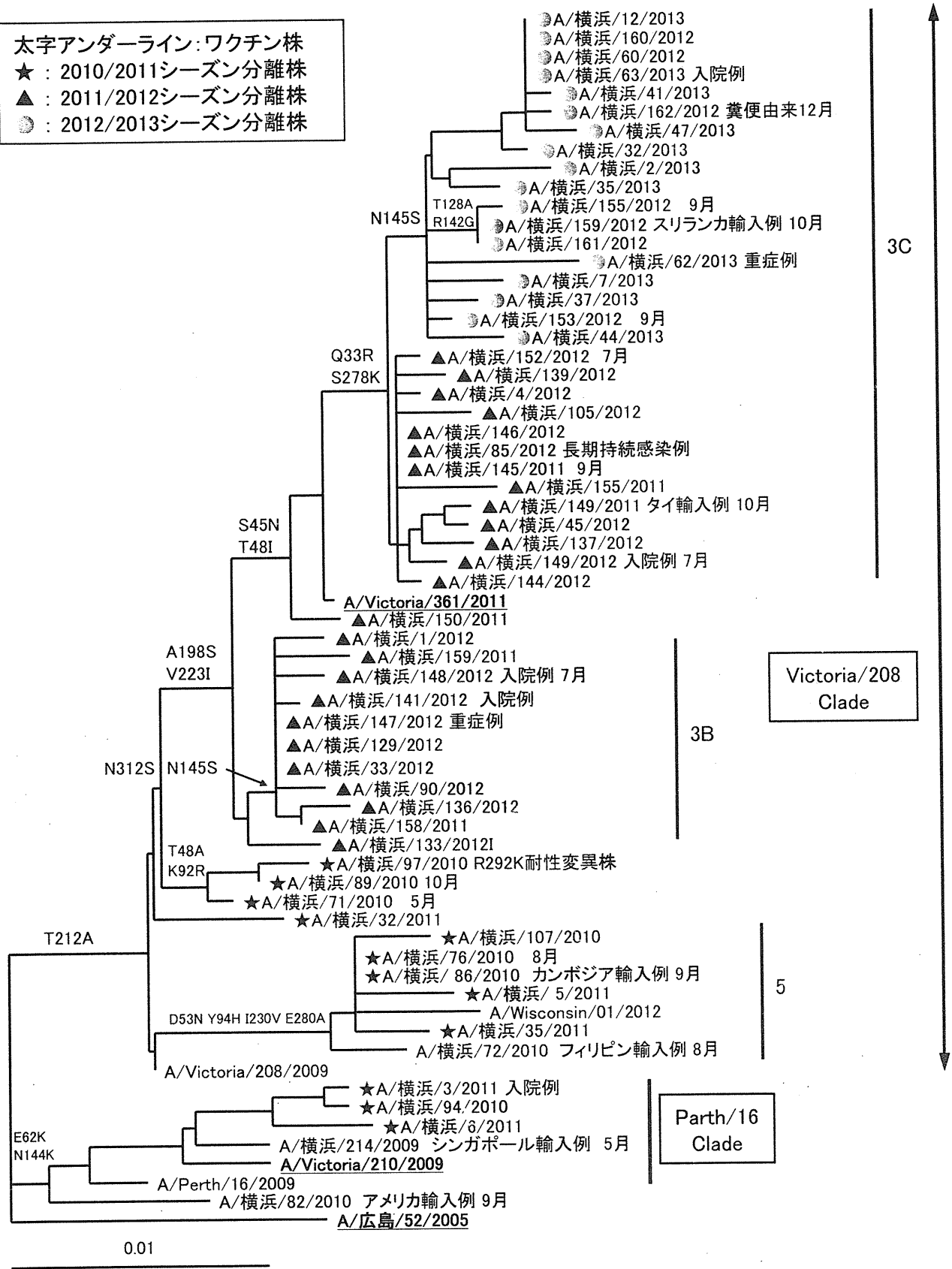


図2 AH3N2 ウイルスの HA1 ポリペプチド (1022 b p) の NJ 系統樹