

2013/14 シーズンに大阪市内で分離された季節性インフルエンザウイルス

久保英幸、改田 厚、入谷展弘、山元誠司、長谷 篤、西尾孝之

Seasonal Influenza Viruses Isolated in Osaka City, 2013/14 influenza season

Hideyuki KUBO, Atsushi KAIDA, Nobuhiro IRITANI, Seiji P YAMAMOTO,
Atsushi HASE and Takayuki NISHIO

Abstract

In Osaka City, 133 strains of influenza virus were isolated during 2013/14 influenza season. AH1pdm09 was the predominant virus and accounted for 48.9 %, differing from the last 2 seasons when AH3 was predominant each. As the feature of 2013/14 season, influenza AH1pdm09, AH3, B/Yamagata lineage and B/Victoria lineage were all isolated during the season, not only in Osaka City but also in all regions in Japan. Four of 65 AH1pdm09 strains were recognized as oseltamivir resistant variant (ORV). These ORV strains showed resistance to oseltamivir and peramivir, and susceptibility to zanamivir and laninamivir. It is significant to detect the occurrence of AH1pdm09 ORV circulation as soon as possible, for proper prescription of neuraminidase inhibitors.

Key words: seasonal influenza viruses, types and subtypes, oseltamivir resistant variant

I 緒言

インフルエンザは世界的規模での流行を引き起こす感染症で、毎年数百万人におよぶ患者が発生することから、最重要感染症の一つに位置付けられている [1]。温帯地域におけるインフルエンザの流行は通常冬季に発生し、その規模や期間は、国・地域および各シーズンによって異なる。ヒトの季節性インフルエンザウイルスは A および B 型に分類され、A 型には A(H1N1)pdm2009 (AH1pdm09) および A(H3N2) (AH3) の 2 亜型が、B 型には Yamagata(B/Yamagata) および Victoria (B/Victoria) の 2 系統が存在している [2, 3]。流行の主流となるインフルエンザウイルスの型・亜型は各シーズンにおいて異なることから、該当シーズンの主流となるウイルスの型・亜型を予測することは不可能とされている [4-7]。

季節性インフルエンザウイルス感染の予防および軽症化には、インフルエンザワクチンの接種が有効とされ、流行開始前のワクチン接種の推奨が毎年実施されている。インフルエンザウイルスの特徴として、主要タンパク質である HA タンパク質の抗原変異が容易に生じる。この現象により、ヒトのこれまでに獲得した免疫効果が無効となってしまう、これが毎年のインフルエンザ流行発生の要因であることが報告されている [8]。各シーズンにおける流行インフルエンザウイルスの型・亜型およびその抗原性状を迅速に把握し、インフルエンザ関連諸機

関に情報提供を行うことは、医療および感染拡大予防対策上の重要な要素となる。

当所では、サーベイランス検査事業として、インフルエンザ様疾患患者から採取された検体を用いたインフルエンザウイルスの分離・同定試験を実施し、得られた結果の本市を始めとする関連行政機関への迅速な情報還元を努めるとともに、各シーズンのインフルエンザ流行状況の把握を行っている。今回、2013/14 シーズンに大阪市内で分離されたインフルエンザウイルスに関する解析を行い、さらにその傾向についての考察を行った。

II 実験

1) インフルエンザウイルスの分離

大阪市感染症発生動向調査事業およびインフルエンザ様疾患集団発生事例検査に供与されたインフルエンザ様疾患患者検体(咽頭ぬぐい液、鼻汁およびうがい液)をイヌ腎上皮細胞由来の MDCK 細胞に接種した後、温度を 35°C、CO₂濃度を 5.0 %に設定したインキュベーター(エスベック)内での培養を行った。細胞培養液には、0.2 %ウシ血清アルブミンおよび 0.25 %トリプシンを添加したイーグル MEM 培地(ライフテクノロジーズ)を使用した。細胞変性効果(CPE)の出現観察を最長 2 週間行い、この観察期間内で CPE の認められた検体をインフルエンザウイルス分離陽性と判定し、培養上清を採集してウイルス保存液とした。

表 1 2013/14 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザウイルス月別採取検体数および分離・検出陽性数

	検体採取月							計
	2013.9	11	12	2014.1	2	3	4	
採取検体数	1	2	12	128	36	26	1	206
分離陽性数	1	2	5	75	28	22	0	133

表 2 2013/14 シーズンに大阪市内において分離されたインフルエンザウイルスの各型・亜型数

型・亜型	検体採取月						計
	2013.9	11	12	2014.1	2	3	
AH1pdm09	1	-	1	36	21	6	65
AH3	-	2	1	12	2	3	20
B(Yamagata 系統)	-	-	2	8	4	8	22
B(Victoria 系統)	-	-	1	19	1	5	26

2) 分離株の型・亜型同定

各分離株のウイルス保存液および 0.75 %モルモット血球(アークリソース)を用いて赤血球凝集(HA)試験を行い、HA 価を測定した。得られた HA 価に基づいて各株のウイルス保存液を一定濃度に希釈し、この希釈液および国立感染症研究所から分与された 2013/14 シーズンインフルエンザウイルス(AH1pdm09、AH3、B)同定用キット(2013/14 シーズンのインフルエンザワクチンに用いたインフルエンザウイルス AH1pdm09、AH3 および B 型各株に対するウサギ免疫血清をキット化したもの)を用いて赤血球凝集阻止(HI)試験を行い、分離株の型・亜型の同定および HI 価の測定を行った[9]。また、HI 試験を行うために必要な HA 価が得られなかったインフルエンザウイルス分離株に対しては、ウイルス RNA 抽出キット(キアゲン)を用いて、ウイルス保存液から RNA を抽出した後に、リアルタイムまたはコンベンショナル RT-PCR を行い、型・亜型を同定した[10]。

3) 分離 AH1pdm09 のオセルタミビル耐性化検索

2013/14 シーズンに、MDCK 細胞で分離された 65 株の AH1pdm09 について、ノイラミダーゼタンパク質の 275 番目のアミノ酸置換を指標とするオセルタミビル耐性化(ORV)検索を行った。本検索は、国立感染症研究所発行のプロトコールに従って実施した[11]。この検索によって ORV であることが確認された 4 株について、日本で市販されている抗インフルエンザ薬であるノイラミダーゼ阻害薬(オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビル)に対する性状解析を、共同研究先である国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター第 1 室にて行った。

III 結果

1) 2013/14 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス株の型・亜型

2013/14 シーズンに大阪市内で採取されたインフルエンザ様疾患患者の検体数は 206 であった。最初の検体は 2013 年 9 月に採取された。その後 11 月から患者検体数が増加し始め、2014 年 1 月が 128 検体でピークとなった。その後 2 月に 36 検体、3 月に 26 検体、および 4 月に 1 検体が採取された。また、大阪市のインフルエンザ発生状況は、1 月中～下旬がピークとなり、その後 2～3 月中旬まで定点あたりの患者数が 15 人以上となった[12]。本シーズンに分離陽性となったインフルエンザウイルス株数は 133 であった。インフルエンザウイルスの分離株数は、2013 年 9 月に 1 株、その後 11 月以降に増加し、2014 年 1 月にピークの 78 株となった。その後の 2 および 3 月に、それぞれ 28 および 22 株が分離された(表 1)。各月に分離されたインフルエンザウイルスの型・亜型数を表 2 に示した。AH1pdm09 は 65 株が、また、AH3 は 20 株がそれぞれ分離された。B 型ウイルスは、B/Yamagata が 22 株および B/Victoria が 26 株分離された。また、これらのほとんどの株(97.8 %)は、2013 年 12 月から 2014 年 3 月に分離された。

2) 各分離インフルエンザウイルス株の HA 価

2013 年 9 月から 2014 年 3 月の期間に分離された各株に対して、0.75 %モルモット血球を用いた HA 試験を行い、各株の HA 価を測定した。分離 AH1pdm09 株の HA 価は <2～64 と様々であった。また、このうちの 53 株(90.0 %)の HA 価は 8～32 であった(表 3)。分離 AH3 株のうちの 18 株の HA 価は <2 であり、残りの 2 株はそれぞれ 4 および 16 であった(表 4)。分離 B/Yamagata の HA 価は、64 が 5 株、128 が 10 株、お

表 3 分離 AH1pdm09 株の各 HA 価を示した株数

HA 価	検体採取月					計
	2013.9	12	2014.1	2	3	
<2	-	-	-	1	-	1
2	-	-	3	-	1	4
4	-	-	1	-	-	1
8	-	-	11	2	3	16
16	-	-	9	11	2	22
32	1	-	8	6	-	15
64	-	1	4	1	-	6

表 5 分離 B 型 Yamagata 系統株の各 HA 価を示した株数

HA 価	検体採取月				計
	2013.12	2014.1	2	3	
64	2	-	2	1	5
128	-	4	2	4	10
256	-	4	-	3	7

よび 256 が 7 株であった(表 5)。分離 B/Victoria 株の HA 価は、32~512 を示した。このうち、24 株(92.3 %)の HA 価は 64~256 であった(表 6)。

3) 各分離インフルエンザウイルス株の HI 価

2013/14 シーズンに分離された各インフルエンザウイルス株のうち、16 以上の HA 価を示した株に対しては、2013/14 シーズンインフルエンザウイルス(AH1pdm09、AH3、B)同定用キットを用いて、引き続き HI 試験を実施して各株の HI 価を測定した。

表 7 分離 AH1pdm09 株の各 HI 価を示した株数

HI 価	検体採取月*					計
	2013.9	12	2014.1	2	3	
160	-	-	2	-	-	2
320	-	-	3	1	-	4
640	1	1	9	17	2	30
1,280	-	-	6	-	-	6
2,560	-	-	1	-	-	1

ホモ抗原に対する HI 価:1,280

*:HI 試験実施可能株の採取された月のみ記載

表 8 分離 B 型 Yamagata 系統株の各 HI 価を示した株数

HI 価	検体採取月*				計
	2013.12	2014.1	2	3	
40	-	2	-	-	2
80	2	3	4	7	16
160	-	3	-	1	4

ホモ抗原に対する HI 価:1,280

*:HI 試験実施可能株の採取された月のみ記載

表 4 分離 AH3 株の各 HA 価を示した株数

HA 価	検体採取月					計
	2013.11	12	2014.1	2	3	
<2	-	1	12	2	3	18
2	-	-	-	-	-	-
4	1	-	-	-	-	1
8	-	-	-	-	-	-
16	1	-	-	-	-	1

表 6 分離 B 型 Victoria 系統株の各 HA 価を示した株数

HA 価	検体採取月				計
	2013.12	2014.1	2	3	
32	-	-	-	1	1
64	1	3	1	-	5
128	-	6	-	1	7
256	-	9	-	3	12
512	-	1	-	-	1

AH1pdm09 では、65 株中 43 株(66.2 %)が HI 試験実施可能となった。このうち 160 の HI 価を示したものが 2 株、320 が 4 株、640 が 30 株、1,280 が 6 株、および 2,560 が 1 株で、ホモ抗原(免疫血清の作製に用いたインフルエンザウイルスワクチン株)の HI 価(1,280)の 4 倍低下以内であったものが 59 株(95.3 %)、また、8 倍低下以上のものが 2 株(4.7 %)であった(表 7)。AH3 では 1 株のみが HI 試験実施可能となり、その HI 価は 5,120 でホモ抗原のものと同じであった。B 型各系統株は、全株が HI 試験実施可能となった。B/Yamagata では、40 の HI 価を示したものが 2 株、80 が 16 株、および 160 が 4 株で、全株がホモ抗原の HI 価(1,280)の 8 倍低下以上であった(表 8)。B/Victoria では、160 および 320 の HI 価を示したものが各 1 株、640 が 12 株、1,280 が 10 株、および 2,560 が 2 株で、ホモ抗原(1,280)の 4 倍低下以内のものが 25 株(96.2 %)、8 倍低下のものが 1 株(3.8 %)であった。(表 9)。

表 9 分離 B 型 Victoria 系統株の各 HI 価を示した株数

HI 価	検体採取月*				計
	2013.12	2014.1	2	3	
160	-	-	1	-	1
320	-	1	-	-	1
640	-	7	-	5	12
1,280	1	9	-	-	10
2,560	-	2	-	-	2

ホモ抗原に対する HI 価:1,280

*:HI 試験実施可能株の採取された月のみ記載

表 10 オセルタミビル耐性を示した AH1pdm09 株の抗インフルエンザ薬に対する性状

株名	検体採取日	抗インフルエンザ薬に対する性状			
		オセルタミビル	ザナミビル	ペラミビル	ラニナミビル
13-1199	2014. 2. 2	耐性	感受性	耐性	感受性
13-1200	2014. 1.31	耐性	感受性	耐性	感受性
13-1264	2014. 2.14	耐性	感受性	耐性	感受性
13-1265	2014. 2.12	耐性	感受性	耐性	感受性

4) 分離 AH1pdm09 のオセルタミビル耐性化検索

2013/14 シーズンに分離された AH1pdm09 のうち、ORV を示した株は 4 株であった。これらの患者検体が採取された期間は 2014 年 1 月 31 日から 2 月 14 日であった。また、これら 4 名の患者における抗インフルエンザ薬投与状況は、3 名には検体採取前にペラミビル投与が実施され(13-1199、13-1200 および 13-1264 株がそれぞれ分離された各患者)、他 1 名の患者(13-1265 株が分離された患者)には検体採取後にペラミビル投与が実施された。ORV を示した 4 株の各抗インフルエンザ薬に対する性状は、いずれもオセルタミビルおよびペラミビルに対して耐性、また、ザナミビルおよびラニナミビルに対して感受性であった(表 10)。

IV 考察

2013/14 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザウイルス分離株は、AH1pdm09 が全体の約半数(48.9 %)となり、本シーズンの主流となった。過去 3 シーズンの AH1pdm09 の大阪市内での分離・検出割合は、2010/11 シーズンは 46.9 %で、B/Victoria (43.2 %)とともに当シーズンの主流となったが、2011/12 シーズンはまったく分離されず、2012/13 シーズンはわずかに 4.6 %であった[13, 14]。AH1pdm09 が主流となったのは 3 シーズンぶりのこととなった。また、2013/14 シーズンの状況として、2013 年 12 月から 2014 年 3 月にかけて AH1pdm09、AH3、B/Yamagata および B/Victoria が分離された。すべての型(亜型および系統)のインフルエンザウイルスがシーズン内の同時期に分離されることはまれで、特に B 型はシーズン後半に分離される傾向が多く認められている[7-8, 13-15]。2013/14 シーズンの上記傾向は、全国においても同様に認められ、本シーズンの特徴として報告されている[16]。

インフルエンザウイルスのおもな抗原エピトープは HA タンパク質上に存在し、また、変異を起こしやすいことから、各シーズン分離株の抗原性状を解析することは、その感染拡大予防対策上の重要な要素となっている。この抗原性状の解析法に HI 試験が応用され、また、分離株の型・亜型同定も可能なことから、HI 試験はインフルエンザウイルス検査の定法とされている[9]。HI 試

験における各分離インフルエンザウイルス株の抗原性状は、抗血清の作製に用いられたワクチン株(ホモ抗原)の HI 価の 4 倍低下以内の場合はワクチン類似株とされ、また、8 倍低下以上ではワクチン変異株と定義されている[17]。2013/14 シーズンに大阪市内で分離された各インフルエンザウイルス株のうち、HI 試験実施が可能で、かつ HI 価がホモ抗原の値の 8 倍以上低下した株は、AH1pdm09 で 3.1 %、B/Yamagata で 100 % および B/Victoria で 3.8 % に認められた(表 7-9)。また、国立感染症研究所で実施した各地方衛生研究所分与株を対象とした HI 試験では、検査を行ったほぼすべての株はワクチン類似株とされ、その中には当所から分与した B/Yamagata 3 株も含まれている[18]。国立感染症研究所から提供されるインフルエンザウイルス同定キットは、2012/13 シーズン以降、それまでのフェレット免疫血清からウサギのものに変更されたが、ウサギ免疫血清では詳細な抗原性状の変化を捉えられない可能性のあることが指摘されている[19]。このため、国立感染症研究所での上記 HI 試験は、フェレット免疫血清を使用して実施されている[18]。この相違が今回の当所および国立感染症研究所における HI 価の乖離の要因の一つと考えられるが、その他の要因については今のところ不明とされ、ウサギ免疫血清を用いた HI 試験での HI 価は参考程度とする方が妥当とのことである(私信)。

日本で使用されているノイラミニダーゼ阻害薬(抗インフルエンザ薬)は現在 4 種類存在し、それぞれの投与経路や投与期間などを考慮して選択使用されている。これらの薬剤のうち、オセルタミビルおよびペラミビルの作用機序は同様で、ORV 株は両薬剤に対して耐性を示すことが報告されている [20]。なお、これまでに検出されたノイラミニダーゼ阻害薬耐性株で、ザナミビルおよびラニナミビルを含むすべての当薬剤に耐性を示す株は報告されていない [21]。ORV に関しては、特に AH1pdm09 においての出現が危惧されていることから、分離された AH1pdm09 株に対しての ORV 検索が毎年実施されているところである。2013/14 シーズンは、大阪市内では 4 株において ORV が検出された。これらの分離された患者 4 名のうちの 3 名に対しては、ペラミビル投与の治療が施されていたことから、これらの ORV 株はペラミビル投与によって出現したことが示唆された。

また、他の 1 名の患者は、検体採取前に抗インフルエンザ薬を投与されていなかったことから、この ORV 株は薬剤投与の影響外、すなわち、自然的に発生した ORV 株に感染した結果、またはオセルタミビルもしくはペラミビルを投与された他の AH1pdm09 感染者から排出された ORV 株に感染した結果であることが考えられた。2013/14 シーズンの国内での ORV 株の出現状況は、大多数は散発的であったが、札幌市およびその周辺地域においては、抗インフルエンザ薬未投与患者からの ORV 株の分離例が多数(2014 年 3 月 28 日の時点で 38 例)認められたことから、この地域での ORV 株の流行発生が報告されている[16, 21]。AH1pdm09 の ORV 検出に関する結果を、関連行政機関および医療機関に対して迅速に情報提供することは、インフルエンザ流行予防対策上非常に重要なことである。特に、的確なノイラミニダーゼ阻害薬投与を行うにあたっては、重要な情報提供になるものと思われる。

V 結論

2013/14 シーズンに大阪市内で分離されたインフルエンザウイルスは、AH1pdm09 が主流で全体の 48.9 % となった。AH1pdm09 が主流となったのは 3 シーズンぶりであった。また、本シーズンにおいては、流行開始時期からすべての型・亜型のインフルエンザウイルスが分離された。分離された AH1pdm09 のうちの 4 株(6.2 %)が ORV 株であった。これらの株はオセルタミビルおよびペラミビルに耐性を、また、ザナミビルおよびラニナミビルに感受性を示した。AH1pdm09 の ORV 出現状況を迅速に把握することは、インフルエンザ流行予防対策上重要なことである。

参考文献

- 1) Cox NJ, and Subbarao K. Global epidemiology of influenza : past and present. Annual review of medicine 2000 ; 51 : 407-421.
- 2) World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014 southern hemisphere influenza season. Weekly epidemiological record 2013 ; 88 : 437-448.
- 3) World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season. Weekly epidemiological record 2014 ; 89 : 93-104.
- 4) 国立感染症研究所, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 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. 2009/10 シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析. 病原微生物検出情報 2010 ; 31 : 253-260.
- 5) 国立感染症研究所, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 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. 2010/11 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. 病原微生物検出情報 2011 ; 32 : 317-323.
- 6) 国立感染症研究所, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 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. 2011/12 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. 病原微生物検出情報 2012 ; 33 : 288-294.
- 7) 国立感染症研究所, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 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. 2012/13 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. 病原微生物検出情報 2013 ; 34 : 328-334.
- 8) Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe Jr JE, and Wilson IA. Structural basis of pre-existing immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. Science 2010 ; 328(5976) : 357-360.
- 9) 国立感染症研究所. インフルエンザ診断マニュアル : 平成 24 年 3 月. 第 2 版. 東京 : 国立感染症研究所 ; 2012.
- 10) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル : H1N1 新型インフルエンザ : 2009 年 11 月. ver.2. 東京 : 国立感染症研究所 ; 2009.
- 11) 国立感染症研究所. H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法実験プロトコール : 2010 年 11 月. Ver.1. 東京 : 国立感染症研究所 ; 2009.
- 12) 大阪市, 大阪市インフルエンザ発生状況, <http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/page/0000101070.html> (2014/7/4).
- 13) 久保英幸, 改田厚, 入谷展弘, 関口純一郎. 大阪市における 2011/12 シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析. 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 2012 ; 74 : 1-4.
- 14) 久保英幸, 改田厚, 入谷展弘, 山元誠司, 長谷篤. 2012/13 シーズンに大阪市内で分離されたインフルエンザウイルスの解析. 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 2013 ; 75 : 11-17.
- 15) 国立感染症研究所, 週別インフルエンザウイルス分離・検出報告数 2009/10~2013/14 シーズン, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-inf.html> (2014/7/4).
- 16) 国立感染症研究所. 今冬のインフルエンザの発生動向 2013/14 シーズン. 東京 : 国立感染症研究所 ; 平成 26 年 3 月 28 日.
- 17) Ann J, Papenburg J, Bouhy X, Rheume C, Hamelin M- E, and Bolvin G. Molecular and antigenic evolution of human influenza A/H3N2 viruses in Quebec, Canada, 2009-2011. Journal of Clinical Virology 2012 ; 53 : 88-92.
- 18) NESID(感染症サーベイランスシステム), 全国データダウンロード,

- <https://nesid3g.wish.mhlw.hq.admix.go.jp/BKWeb/svc?action=BkMi000306> (2014/7/4).
- 19) 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター. 2012/13 シーズンインフルエンザウイルス (A/H1pdm09、AH3、B)同定用キットの送付について. 2012(平成 24)年 10 月 15 日
- 20) Baz M, Abed Y, and Bolvin G. Characterization of drug-resistant influenza A/H1N1 viruses selected in vivo with peramivir and zanamivir. *Antiviral research* 2007 ; 74 : 159-162.
- 21) 国立感染症研究所, 札幌市衛生研究所, 札幌市保健所, 国立病院機構仙台医療センター. 2013/14 シーズンに札幌市で検出された抗インフルエンザ薬耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルス. *病原微生物検出情報* 2014 ; 35(2) : 12-13.