

2010/2011年シーズンの札幌市におけるインフルエンザの 流行状況およびオセルタミビル耐性サーベイランスについて

菊地正幸 佐藤寛子 扇谷陽子 伊藤はるみ 高橋広夫 三觜 雄

1. はじめに

札幌市においては、病原体情報を収集するため、市内医療機関（病原体検査定点）の協力のもとにウイルス分離を行っている。それらのウイルスの分離成績を基に、2010/2011年シーズンの札幌市におけるインフルエンザの流行状況について報告する。また、日本はオセルタミビル（商品名タミフル）の使用量が多く、オセルタミビル耐性ウイルス株の発生状況を把握することは重要である。そこで、当所で分離されたA型インフルエンザウイルス(H1N1)2009のオセルタミビル耐性の発生状況について報告する。

2. 方法

2-1 材料

2010年10月から2011年5月までの間に、市内医療機関（小児科 10定点、内科 4定点）を受診した患者から採取された咽頭拭い液等合計586検体（小児科558検体、内科28検体）をウイルス分離の検査材料とした。

2-2 ウイルス分離

検査材料をMDCK細胞（イヌ腎臓由来株化細胞）に接種し、33°Cで培養した。同時にアデノウイルス等の他の呼吸器疾患原因ウイルスの分離を目的として検体をKB、RD-18S細胞等に接種し、36°Cで培養した。継代は3代まで実施した。細胞変性効果（cytopathogenic effect : CPE）陽性を確認し、一定のHA（hemagglutination）価を示した分離株について型別同定を行った。

2-3 ウイルスの同定

インフルエンザウイルスの同定には、国立感染症

研究所（以下、感染研）分与のフェレット感染抗血清および家兎高度免疫血清を使用した。分離ウイルスのHI（hemagglutination inhibition）試験は、0.75%モルモット赤血球および0.5%七面鳥赤血球を用い、マイクロタイター法により実施した。

アデノウイルスはKB細胞でCPEを確認した後、中和法により血清型別を行った。血清型別には、感染研分与の抗血清およびデンカ生研製アデノウイルス抗血清を使用した。

エンテロウイルスはKB、RD-18SまたはVero細胞等でCPEを確認後、感染研分与の抗血清およびデンカ生研製エンテロウイルス抗血清を使用して中和法により同定した。

ヘルペスウイルスはRD-18S細胞でCPEを確認後、ヘルペス（1・2）FA試薬「生研」（デンカ生研）による蛍光抗体法により型別した。

2-4 インフルエンザウイルスの同定・検査に使用した抗血清

A/California/7/2009(H1N1)pdm

A/Brisbane/59/2007 (H1N1)

A/Victoria/210/2009 (H3N2)

B/ Brisbane /60/2008

B/Bangladesh/3333/2007

2-5 オセルタミビル耐性試験

インフルエンザウイルス（H1N1）2009と同定されたウイルス培養上清を滅菌蒸留水を用いて10倍希釈して、感染研から示された「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）」に準じて、2種類の異なる蛍光色素で標識されたTaqMan Probeを用いたOne-step RT-PCRによ

り、ノイラミニダーゼ (NA) 遺伝子についてオセルタミビル耐性株の耐性マーカーであるH275Y変異の有無を確認した。変異が確認された分離株については、感染研で薬剤感受性試験を実施した。

3. 結果

3-1 ウイルス分離・検出状況

2010/2011年シーズンの札幌市のサーベイランス検体におけるインフルエンザウイルスの初分離は、2010年10月7日(第40週)採取の咽頭拭い液3検体から分離したA香港型インフルエンザウイルス(AH3)であった。その後、A香港型インフルエンザウイルス(AH3)は、2010年48週(11/29~12/5)に18株分離されたのをピークに第51週(12/20~12/26)から2011年第3週(1/17~1/23)まで一桁の分離数で推移していたが、第5週(1/31~2/6)に13株に増加した。最終的に2011年第19週(5/9~5/15)に1株検出されるまで長期間継続して分離され、シーズン合計173株分離された。

B型インフルエンザウイルスは、A香港型インフルエンザウイルス(AH3)の分離数が増加し始めた2010年11月25日(第47週)に採取された咽頭拭い液から初めて分離された。翌週に1株分離された後、2011年第4週(1/24~1/30)に5株分離されるまで分離されなかった。第4週以降は第22週(5/30~6/5)に1株分離されるまで合計73株分離された。

A型インフルエンザウイルス(H1N1)2009は、2010年第50週(12/13~12/19)に採取された咽頭拭い液から初めて2株分離された。その後、年明けの第1週(1/3~1/9)に再び分離されてから分離数が増加し、第3週および第4週にそれぞれ24株分離されたのをピークに第16週(4/18~4/24)に1株検出されるまで合計102株分離された(図1、表1)。

2010年10月から2011年5月までに上記のインフルエンザウイルス以外には、アデノウイルス14株、エンテロウイルス4株、単純ヘルペスウイルス1型1株が分離された(表1)。Aソ連型インフルエンザウイルス(AH1)は分離されなかった。

表1 小児科・内科病原体定点の検体からのウイルス分離・検出状況

検体採取年月	2010/10	11	12	2011/1	2	3	4	5	合計
分離ウイルス / 検体数	36	72	84	139	103	81	34	37	586
Influenza A(H1)2009			2	71	23	5	1		102
Influenza A(H3)	9	26	50	29	30	25	3	1	173
Influenza B		2		5	13	19	19	15	73
Adeno 1			6	1					7
Adeno 2	1					2			3
Adeno 3	1			1				1	3
Adeno 5			1						1
Coxsackie A10								1	1
Coxsackie B4			1						1
Echo 3		1							1
Polio 1	1								1
Herpes simplex 1					1				1

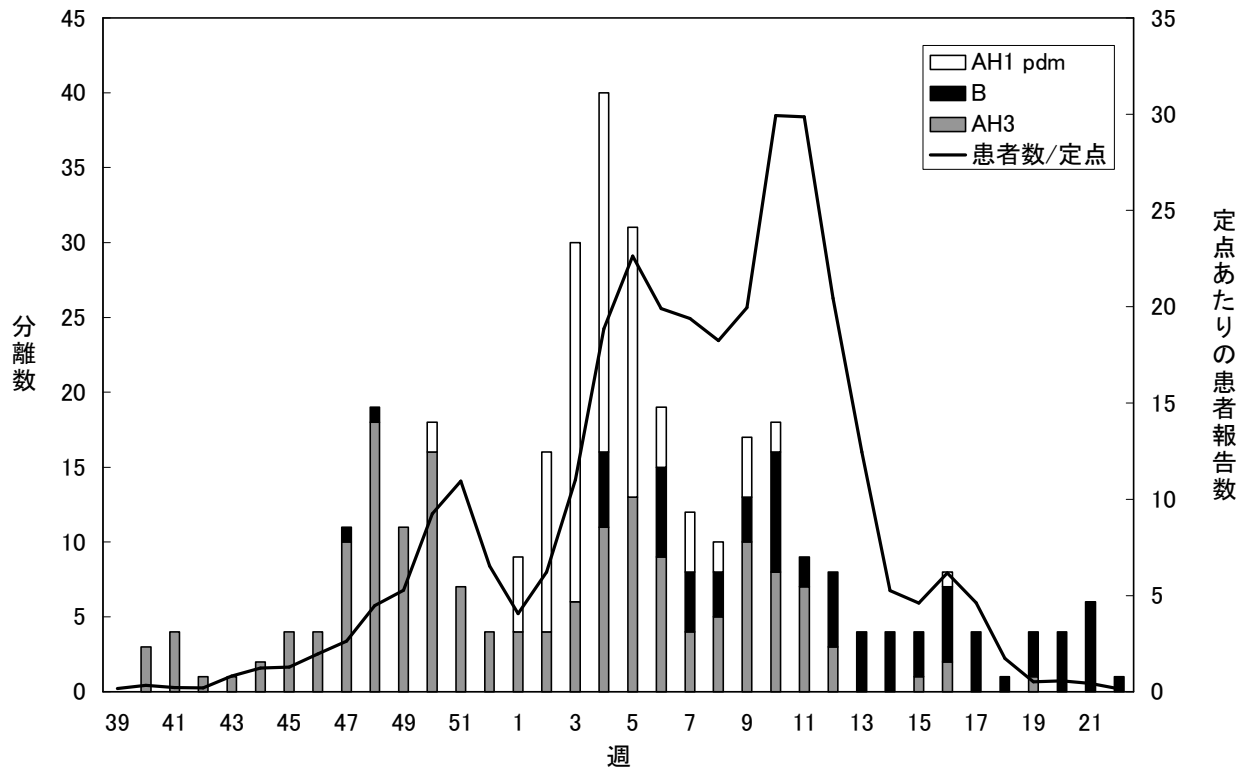


図1 週別インフルエンザ患者報告数とインフルエンザウイルス分離・検出数

3-2 分離ウイルスの性状

表2に2010/2011シーズンインフルエンザサーベイランスキットに含まれる抗血清のHI抗体価と分離されたインフルエンザウイルスの代表的な株についてHI価を示す。今シーズンに分離されたA香港型インフルエンザウイルス (AH3) は、ワクチン株であるA/Victoria/210/2009 (H3N2) 抗血清(ホモ価2560)に対してHI価は160~1280と幅があった。

73株分離されたB型ウイルスのうち72株は、B/Victoria/2/87に代表されるビクトリア系統に属

するB/Brisbane /60/2008類似株であり、そのうち1株は抗血清 (ホモ価1280) に対してHI価80を示し、それ以外の株のHI価は320~2560と幅があった。

B型ウイルス1株は、B/Yamagata/16/88に代表される山形系統に属するB/Bangladesh/3333/2007 (ホモ価1280) に対してHI価1280を示した。

A型インフルエンザウイルス (H1N1) 2009 分離株については、A/California/7/2009 (H1N1) pdm 抗血清 (ホモ価 1280) に対し HI 価 640~2560 を示した。

表 2 2010/2011 シーズンにおけるインフルエンザウイルス分離株の性状

抗原	抗血清に対する HI 価					
	抗血清	A/ California/ 7/2009	A/ Brisbane/ 59/2007	A/ Victoria/ 210/2009	B/ Brisbane/ 60/2008	B/ Bangladesh/ 3333/2007
A/California/7/2009 (H1N1pdm)		1280	<10	<10	<10	<10
A/Brisbane/59/2007 (H1N1)		<10	1280	<10	<10	<10
A/Victoria/210/2009 (H3N2)		<10	<10	2560	<10	<10
B/Brisbane /3/2007		<10	<10	<10	1280	10
B/Bangladesh/3333/2007		<10	<10	<10	20	1280
A/札幌/115/2010 (H1pdm)		1280	<10	<10	<10	<10
A/札幌/19/2011 (H1pdm)		2560	<10	<10	<10	<10
A/札幌/47/2010 (H3)		<10	<10	160	<10	<10
A/札幌/80/2010 (H3)		<10	<10	1280	<10	<10
B/札幌/15/2010		<10	<10	<10	640	20
B/札幌/41/2011		<10	<10	<10	80	10
B/札幌/34/2011		<10	<10	<10	80	1280

3-3 オセルタミビル耐性試験結果

A型インフルエンザウイルス (H1N1) 2009が分離された分離株88株について、TaqMan Probeを用いた One-step RT-PCRにより、オセルタミビル耐性株の耐性マーカーであるNAタンパク質の275番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンへ変異 (H275Y) の有無を確認した。その結果、1株についてNA遺伝子のH275Y変異が確認され、さらにNA遺伝子の部分領域の塩基配列を決定したところ、同様にH275Y変異が確認された。また、この分離株を感染研に送付して抗ウイルス薬感受性試験を実施したところ、オセルタミビルおよびペラミビル (商品名ラピアクタ) に対して感受性が著しく低下していることが確認された。一方、ザナミビル (商品名リレンザ) およびラニナミビル (商品名イナビル) に対しては感受性を保持していた。また、感染研分与の家兎免疫血清 (抗A/California/7/2009 (H1N1)pdm) を用いた HI試験を実施した結果、これらオセルタミビル耐性株は感受性株と同様に抗原性はワクチン株である

A/California/7/2009 (H1N1)pdmに類似していた。

オセルタミビル耐性株が分離された検体は、2011年1月14日に採取されたインフルエンザ定点医療機関において採取された。この患者は、1月12日に発熱 (38.5℃)、咳、咽頭痛、痰および鼻水の症状があり、14日に市内医療機関を受診しザナミビルを処方されたが、オセルタミビルの服用の有無や患者周辺の流行状況等の情報は得られなかった。その後、患者周辺地域でのオセルタミビル無効例は確認されなかった。

4. まとめ

2010/2011年シーズンの札幌市におけるインフルエンザの患者報告は、第44週 (11/1~11/7) に定点あたり患者数が1.0を超え、その後、患者報告数は徐々に増加して、第51週 (12/20~12/26) には10を超えたが、翌週から減少に転じた。年が明けて2011年第2週 (1/10~1/16) から再び患者報告数は増加し、第5週 (1/31~2/6) に22を超え、その後

20程度で推移していたが、第10週(3/7~3/13)と第11週(3/14~3/20)に約30とピークとなった。その後、患者報告数は徐々に減少に転じ、第14週(4/4~4/10)には定点あたり患者数が10未満に、第19週(5/9~5/15)には1未満となり、以降低いレベルで推移した(図1)。

インフルエンザウイルスについては、流行初期にはA香港型インフルエンザウイルス(AH3)が主流であり、流行のピーク時にはA香港型インフルエンザウイルス(AH3)に加えてA型インフルエンザウイルス(H1N1)2009とB型インフルエンザウイルスが混合流行していたと思われる。シーズン後半には、A香港型インフルエンザウイルス(AH3)とA型インフルエンザウイルス(H1N1)2009が減少したが、B型インフルエンザウイルスは継続的に分離され主流株となった。分離されたウイルス型別の比率は、A香港型インフルエンザウイルス(AH3)が49.7%と半数近く分離され、次いで、A型インフルエンザウイルス(H1N1)2009が29.3%、B型ウイルスが21.0%であった。

今シーズンは、A香港型インフルエンザウイルス(AH3)が2010年10月に初分離され、それ以降12月にピークを迎え、2011年3月まで継続して分離され、最終的には5月まで分離された。2011年1月からはA型インフルエンザウイルス(H1N1)2009の分離数が急増した。また、2011年1月末からはB型も分離され、5月末まで継続して分離された。これらの患者報告数およびウイルス分離の動向から、2010年内における患者数のピークはA香港型インフルエンザウイルス(AH3)によるものであり、2011年に入ってからA型インフルエンザウイルス(H1N1)2009とB型インフルエンザウイルスが加わった混合流行であったと考えられる。

今シーズン分離されたA香港型インフルエンザウイルス(AH3)については、ワクチン株であるA/Victoria/210/2009(H3N2)抗血清(ホモ価2560)に対してHI価は160~1280と幅があり、ワクチン株と抗

原性が異なるウイルスが混在していた可能性があると思われる

A型インフルエンザウイルス(H1N1)2009は、ワクチン株であるA/California/7/2009(H1N1)pdm抗血清(ホモ価1280)に対してHI価は640~2560を示して、抗原性が大きく変わる株は無かった。

分離されたB型ウイルスの大部分(73株中72株)は、B/Victoria/2/87に代表されるビクトリア系統に属するB/Brisbane/60/2008類似株であり、そのうち1株は抗血清(ホモ価1280)に対してHI価80を示し、それ以外の株のHI価は320~2560と幅があった。

残りのB型ウイルス分離株1株については、B/Yamagata/16/88に代表される山形系統に属するB/Bangladesh/3333/2007(ホモ価1280)に対してHI価1280を示した。

2008/2009シーズン以降、日本では季節性Aソ連型インフルエンザウイルス(AH1)のオセルタミビル耐性株の出現頻度が急激に上昇し、札幌市でも解析した全ての分離株でオセルタミビル耐性を示す変異が確認された¹⁾。2009年にメキシコ、アメリカで発生したA型インフルエンザウイルス(H1N1)2009は、日本を含む世界各国に感染が広がり、以前からオセルタミビルの使用量が世界的にも多く、医療機関における患者の治療方針や治療効果に対して大きな影響があることから、耐性株の発生状況を把握して情報を公開・提供することが重要となっている。

札幌市における昨シーズンのオセルタミビル耐性ウイルスの発生頻度は0.58%であった¹⁾。今シーズンについては、A型インフルエンザウイルス(H1N1)2009分離株88株を解析したところ1株のオセルタミビル耐性ウイルスが確認され、発生頻度は1.1%であった。全国的には、オセルタミビル耐性株の出現頻度は2.1%(78/3748)であり、地域的な広がりはない。(2011年9月5日現在)²⁾。

インフルエンザウイルスの分離やその抗原性などの性状を明らかにすることは、インフルエンザの

流行状況の把握、流行予測およびワクチン株の選定などの流行予防対策に役立てることが可能であり、また、薬剤耐性ウイルスのサーベイランスは、患者の治療を含めた感染症対策に重要である。さらには新たな新型ウイルス対策の一環としても、インフルエンザの発生動向に注意を払い、監視を続けることが重要である。

5. 文 献

- 1) 菊地正幸, 村椿絵美, 扇谷陽子他: 札幌市における新型インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性サーベイランス, 札幌市衛生研究所年報, 37, 111-113, 2010
- 2) 全国地方衛生研究所, 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一室: 2009年5月~2011年における抗インフルエンザ薬耐性株 (A/H1N1pdm09) 検出情報 (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/influ.html>)