

原著

福岡県で分離されたインフルエンザウイルス株の抗原及び薬剤耐性に関する遺伝子レベルでの解析

世良暢之、江藤良樹、中山志幸、石橋哲也、千々和勝己

福岡県における過去3年間のインフルエンザ流行状況、分離されたインフルエンザウイルス株の抗原変異や薬剤耐性を把握することを目的として遺伝子レベルでの解析を行った。インフルエンザ患者の流行は例年12月中旬に始まり2月初旬に患者報告のピークを迎え、分離されたインフルエンザウイルス株の亜型は平成17年度、18年度はA/H3型が最も多く分離され、平成19年度はA/H1型が優位であった。抗原解析の結果、A/H1型の分離株はワクチン株であるA/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) 株類似株であり、A/H3型の分離株はワクチン株であるA/Hiroshima/52/2005 (H3N2) 株から変異してきていた。赤血球凝集素 (Hemagglutinin, HA) 遺伝子の解析では平成17、18及び19年度に分離されたインフルエンザウイルスA/H1N1型の分離株はワクチン株であるA/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) 株及びA/New Caledonia/20/99 (H1N1) 株から分岐していること、A/H3N2型の分離株ではワクチン株であるA/Hiroshima/52/2005 (H3N2) 株と近縁であること、B型の分離株でも同様にワクチン株であるビクトリア系統株のB/Malaysia/2506/2004株と近縁であることが分かった。平成18及び19年度の分離株のノイラミニダーゼ遺伝子の解析を行ったところ、塩基配列決定を行った55株の全てにおいて、インフルエンザ治療薬であるリン酸オセルタミビルに対する耐性獲得に必要なアミノ酸変異は見られなかった。しかしヨーロッパ、アメリカにおいては、リン酸オセルタミビル耐性株が高頻度に検出されていることから、日本においても耐性株が出現する危険性が考えられるため、今後も継続的な監視の必要があると考えられる。

[キーワード：インフルエンザウイルス、抗原変異、薬剤耐性株]

1 はじめに

インフルエンザウイルスは大きくA、B及びC型に分けられ、さらにA型インフルエンザウイルスには赤血球凝集素 (Hemagglutinin, HA, 16亜型) とノイラミニダーゼ (Neuraminidase, NA, 9亜型) の組み合わせにより様々な亜型が存在し、ヒト、トリ及びブタ等多くの宿主に広く分布する。HAとNAは同一の亜型内で抗原性を毎年変異させて巧みにヒトの免疫機構から逃れ (連続抗原変異、antigenic drift)、さらにA型は10年以上の間隔で、突然別の亜型に取って代わり (不連続抗原変異、antigenic shift) 大流行を引き起こす。1918年にはスペインかぜA/H1N1型、1957年にはアジアかぜA/H2N2型、1968年には香港かぜA/H3N2型、1977年にはソ連かぜ A/H1N1型が出現、流行している¹⁾。1997年には香港でトリインフルエンザウイルスA/H5N1が初めて人へ感染したことが確認され、東南アジアなどでヒトへの感染例の報告があり、新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている²⁾。さらに欧州ではここ数年インフルエンザ治療薬であるノイラミ

ニダーゼ阻害薬に対する薬剤耐性ウイルスが高頻度で出現し、インフルエンザ治療を困難にする可能性が指摘されている^{3,4,5)}。

当県はアジアの玄関口として、新型インフルエンザの発生が危惧されている地域に近い地理的条件を抱えており、毎年流行するインフルエンザの患者情報、インフルエンザウイルスの抗原性や薬剤耐性を解析してその動向を監視すると同時に、流行時にはマスクの着用や手洗いの励行を促すなどの感染予防対策に有用な情報を迅速に提供することが要求される。そのため、当所において平成17、18及び19年度の過去3シーズンのインフルエンザ患者の発生状況及びインフルエンザウイルス株の分離状況、分離されたインフルエンザウイルス株の抗原解析、HA遺伝子及び薬剤耐性に関するNA遺伝子について検討した。

2 方法

2・1 インフルエンザ患者情報及び分離株情報

インフルエンザの流行状況を把握するためのインフルエンザ患者発生情報は福岡県内にある198インフルエンザ定点（感染症発生動向調査事業において患者数等を一定基準に従って報告する指定医療機関）より毎週報告される患者数を集計した福岡県感染症情報（福岡県保健環境研究所ホームページ内）のデータを用いた⁶⁾。インフルエンザウイルスの分離用の検体としては、平成17、18及び19年度の感染症発生動向調査事業に係わる検査で採取されたインフルエンザ患者の咽頭拭い液（平成17年度123検体、平成18年度77検体及び平成19年度79検体の合計279検体）及びインフルエンザ集団発生事例に係わる検査で採取されたインフルエンザ患者の咽頭ぬぐい液（平成17年度は21検体、平成18年度は20検体及び平成19年度は28検体の合計69検体）を用いた。検体は遠心上清（3000回転、20分間）した上清をイヌ腎臓由来上皮細胞（Madin-Darby canine kidney細胞、MDCK細胞）に接種して観察を行い、細胞変性効果（cytopathic effect、CPE）が確認された培養上清を材料に、モルモット血球あるいはニワトリ血球を用いて凝集活性を調べた。凝集活性が認められた培養上清は国立感染症研究所（感染研）より分与された2007/08シーズン検査キットの複数のフェレット抗血清を用いた赤血球凝集抑制（Hemagglutinin Inhibition, HI）試験によりA及びB型の同定を行った⁷⁾。

2・2 抗原解析

インフルエンザウイルス株の抗原解析は「厚生労働省感染症発生動向調査に基づくインフルエンザサーベイランス」事業として感染研ウイルス第3部第1室（インフルエンザウイルス室）と全国78地方衛生研究所の共同研究として行われている。実際には感染研が抗原解析用抗体パネル[A/New Caledonia/20/99 (H1N1)、A/Hiroshima(広島)/52/2005 (H3N2)、B/Shanghai (上海)/361/2002 (山形系統)、B/Malaysia/2506/2004 (ビクトリア系統)]を用いた赤血球凝集抑制試験によって、抗原解析を行っている。

平成19年度に当所で分離され、感染研からの依頼により分与したインフルエンザウイルス株（AH1型2株及びAH3型1株）は、解析後、感染症サーベイランスシステム（National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease, NESID）の病原体検出情報システムにより情報還元された。

2・3 HA遺伝子解析

分離されたインフルエンザウイルス株のうち、平成17年度に分離されたインフルエンザウイルス17株（A/H1N1型1株、A/H3N2型16株）、平成18年度に分離されたインフルエンザウイルス36株（A/H1N1型4株、A/H3N2型21株、B型11株）及び平成19年度に分離されたインフルエンザウ

イルス55株（A/H1N1型55株）の合計108株について、HA遺伝子の解析を行った。

まずCPEが観察されたMDCK細胞の培養上清から市販キット（QIAamp Viral RNA Mini Kit、QIAGEN社）を用いて抽出したRNAを鋳型に逆転写反応（Reverse Transcription、RT）を行い、相補的DNA（complimentary DNA、cDNA）を生成した。次にcDNAを鋳型にインフルエンザウイルスのHA遺伝子を標的にした特異的プライマーを用いて増幅反応（Polymerase Chain Reaction、PCR）を行い、増幅できたPCR産物はアガロースゲル電気泳動でその分子量を測定した。各インフルエンザウイルスのHA遺伝子に対するプライマーは、A/H1((+)5'-AGCAAAAGCAGGGGAAATAA-3'、(-)5'-GCTATTTTCTGGGGTGAATCT-3')、A/H3((+)5'-AGCAAAAGCAGGGGATAATTC-3'、(-)5'-TGCTGAAACCGTACCACC-3')、B((+)5'-AGCAGAAGCGTGCAATTTTC-3'、(-)5'-ACCAGCAATAGCTCCGAAGA-3')で、最初の変性反応94℃で2分間、PCR条件として94℃で1分間、45℃で1分間、72℃で3分間を30サイクルとして実施し、最後の伸長反応は72℃で5分間行った⁷⁾。予想されたPCR産物が得られた場合は（A/H1型の場合は729塩基対、A/H3型の場合は1143塩基対及びB型の場合は1142塩基対）、ダイレクトシーケンスにより塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列は遺伝子配列解析ソフトウェアSeqScape（Applied Biosystems社）、MegAlign（DNASTAR社）及び日本DNAデータベース（DDBJ）を利用したBLAST検索（Basic Local Alignment Search Tool、アメリカの国立研究所の1つであるNational Center of Biotechnology Informationが開発したDNAの相同性検索を行うソフトウェア）により解析、分子系統樹の作成を行った。比較対象として用いたワクチン株（A/Solomon Islands3/2006(H1N1)株、A/New Caledonia/20/99(H1N1)株、A/Hiroshima/52/2005(H3N2)株、B/Malaysia/2506/2004株及びB/Shanghai/361/2002株）のHA遺伝子の塩基配列はDDBJより取得した。

2・4 薬剤耐性

国内で広く使用されているインフルエンザ治療薬であるリン酸オセルタミビル（Oseltamivir）（商品名「タミフル（Tamiflu）」）に対する薬剤耐性の解析には、薬剤耐性の獲得に重要であると報告されているNAの耐性変異の有無を調べることで行った^{3,4,5)}。分離されたインフルエンザウイルス株のうち、平成18年度に分離されたインフルエンザウイルスA/H1N1型4株及び平成19年度に分離されたインフルエンザウイルスA/H1N1型51株の合計55株について、NAの薬剤耐性変異を検討した。リン酸オセルタミビルの標的蛋白質であるNAのアミノ酸をコードする遺伝子領域をRT-PCR法により増幅し、予想されたPCR産物が得られた場合は、ダイレクトシーケンスにより耐性変異（119、198、274、292及び294番目のアミノ酸変

異)の有無を調べ、これら5箇所のアミノ酸変異をリン酸オセルタミビル耐性の指標とした^{3,4,5)}。PCRに用いたプライマーはN1-F671-693(TGAGAACACAAGAGTCTGAATGT)及びN1-R1079-1057(CCTATCCAACACCATTACCATA)、反応はRT反応条件50°Cで30分間、最初の変性反応94°Cで2分間、PCR条件として94°Cで2分間、45°Cで1分間、72°Cで2分間を30サイクルとして実施し、最後の伸長反応は72°Cで10分間行った。得られた塩基配列は遺伝子配列解析ソフトウェアSeqScape (Applied Biosystems社)及びMegAlign (DNASTAR社)により解析、分子系統樹解析を行った。

3 結果及び考察

3・1 インフルエンザ流行状況

福岡県における平成18年1月～20年3月までのインフルエンザ患者の流行状況を図1(a)に、平成19年1月～20年3月までのインフルエンザウイルス株の分離状況を図1(b)及び(c)に示した。感染症発生動向調査事業によると、インフルエンザ患者の流行時期・規模は年により異なるものの、例年12月中旬に始まり、2月初旬に患者報告のピークを迎え、その後3～4月まで患者発生が続くパターンを示す。平成18年は第3週にピークとなり定

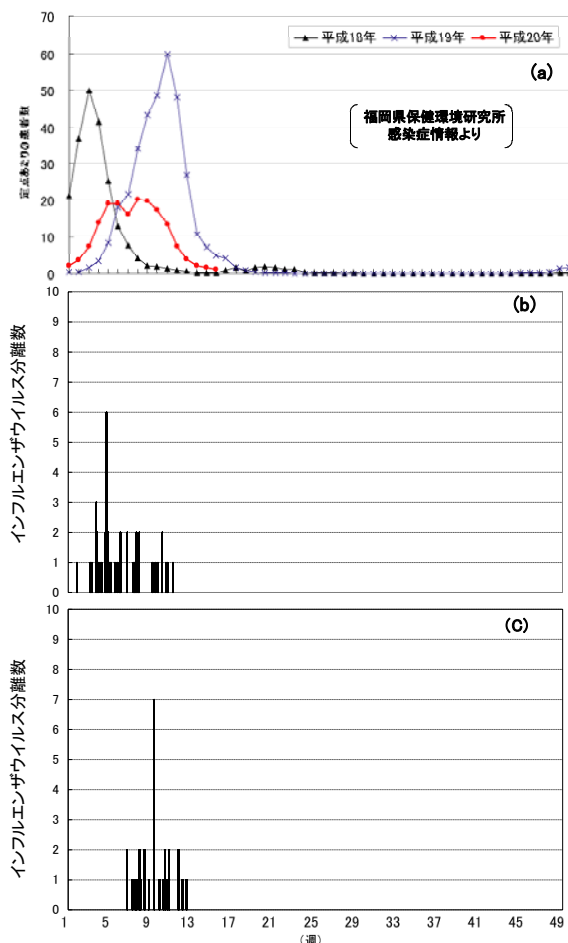


図1 福岡県における定点あたりインフルエンザ患者数(a)、平成19年(b)及び平成20年(c)のインフルエンザウイルス分離株の週別推移状況

点あたり患者数49.90)、第25週まで続いた。平成19年は流行開始が例年より遅かった分、流行のピークも第11週と遅く(定点あたり患者数60.8)、第19週まで続いた。平成20年は第6週にピークとなったものの(定点あたり患者数19.77)、一旦減少し、第8週に再び増加してピークとなり(定点あたり患者数20.54)、第17週まで続いた。

当所におけるインフルエンザウイルス株の分離も患者報告の多い時期とほぼ一致していた。分離されたインフルエンザウイルス株の亜型は平成17年度、18年度はA/H3型が最も多く分離され、平成19年度年はA/H1型が優位であった。

3・2 抗原解析

当所で分離されたインフルエンザウイルス株について感染研より情報還元された結果(表2)によると、A/H1型のA/FUKUOKA/34/2007株はA/Solomon Islands/3/2006血清(ホモ価×640)、A/Fukushima141/2006血清(ホモ価×2,560)、A/Brisbane/59/2007(Egg No. 2)血清(ホモ価×640)及びA/Brisbane/59/2007(Cell No. 2)血清(ホモ価×1,280)に対して、320の高いHI価を示し、A/New Caledonia/20/99血清、A/St. Petersburg/08/2006血清に対し80以下の低いHI価を示した。A/FUKUOKA/25/2008株はA/Brisbane/59/2007(Cell No. 2)血清に対して、1,280の最も高いHI価を示し、A/New Caledonia/20/99血清、A/St. Petersburg/08/2006血清に対して160の低いHI価を示した。A/H3型のA/FUKUOKA/19/2008株はA/Lyon/1331/2006血清に対して、640の最も高いHI価を示し、ワクチン株であるA/Hiroshima/52/2005血清、A/Brisbane/10/2007(X-171A)血清及びA/Brisbane/10/2007(X-171)血清に対して160の低いHI価を示した。これらの結果から、A/H1型の分離株は2007/2008シーズンのワクチン株であるA/Solomon Islands/3/2006(H1N1)株類似株であり、2005/2006及び2006/2007シーズンのワクチン株であるA/New Caledonia/20/99株から変異しており、A/H3型の分離株も2006/2007及び2007/2008シーズンのワクチン株であるA/Hiroshima/52/2005(H3N2)株から変異していたと考えられた。

3・3 HA遺伝子解析

平成17、18及び19年度に分離されたインフルエンザウイルスA/H1N1型5株、A/H3N2型37株及びB型11株のHA蛋白質の遺伝子領域についてHA遺伝子の解析を行い、代表株の分子系統樹解析結果を図2に示した。A/H1N1型では分離株はワクチン株であるA/Solomon Islands3/2006(H1N1)株及びA/New Caledonia/20/99(H1N1)株から分岐して

表2 福岡県で分離されたインフルエンザウイルス株と参照抗原の各抗血清に対する赤血球凝集抑制価

		各抗原の抗血清に対する赤血球凝集抑制価 (HI)						
NIID-ID	ウイルス抗原	NewCal Lot.05	St. Petersburg 0806 No.2	Solomon Islands 0306 No.2	Fukushima97 No.1	Fukushima141 No.1	Brisbane5907 Egg No.2	Brisbane5907 Cell No.2
参照抗原 (A/H1株)								
98/99 - 1118	A/New Caledonia/20/99	640	320	160	40	320	80	80
06/07 - 154	A/St. Petersburg/08/2006	320	160	80	40	320	80	40
06/07 - 57	A/Solomon Islands/3/2006	160	640	640	640	1280	1280	640
05/06 - 287	A/FUKUSHIMA/97/2006	80	640	640	320	2560	640	160
05/06 - 727	A/FUKUSHIMA/141/2006	320	640	640	320	2560	1280	320
07/08 - 130	A/Brisbane/59/2007	80	320	320	160	1280	640	320
07/08 - 129	A/Brisbane/59/2007	40	80	80	160	160	320	1280
分離抗原								
07/08 - 196	A/FUKUOKA/34/2007	80	40	320	160	320	320	320
07/08 - 330	A/FUKUOKA/25/2008	160	160	320	320	320	320	1280

		各抗原の抗血清に対する赤血球凝集抑制価 (HI)								
NIID-ID	ウイルス抗原	Hiroshima520 5 No.2	Nepal92106 No.1	Canada121206 No.2	Brisbane1007 No.2	Brisbane1007 X- 171A CDC	Brisbane1007 X-171 CDC	Uruguay71607 No.1	Hawaii0806 No.1	Lyon13310 6 No.1
参照抗原 (A/H3株)										
05/06 - 10	A/HIROSHIMA/52/2005	1280	320	320	640	640	640	640	640	1280
06/07 - 153	A/Nepal/921/2006	320	640	640	320	640	320	320	640	640
06/07 - 680	A/Canada/1212/2006	40	160	320	80	40	40	80	80	160
06/07 - 628	A/Brisbane/10/2007	640	160	320	640	640	640	640	640	640
07/08 - 2	A/Brisbane/10/2007 (X-171A)	640	640	640	320	1280	640	640	1280	1280
07/08 - 1	A/Brisbane/10/2007 (X-171)	1280	640	1280	640	2560	1280	1280	1280	2560
07/08 - 181	A/Uruguay/716/2007	640	640	640	320	1280	640	1280	640	1280
06/07 - 681	A/Hawaii/08/2006	80	80	160	160	80	80	160	320	320
06/07 - 679	A/Lyon/1331/2006	40	80	80	160	40	40	80	160	320
分離抗原										
07/08 - 331	A/FUKUOKA/19/2008	160	320	320	320	160	160	320	320	640

いることが示された。特にA/New Caledonia/20/99 (H1N1) 株から抗原性が変異していることは抗原解析の結果からも明らかであった。A/H3N2型ではワクチン株であるA/Hiroshima/52/2005 (H3N2) 株と近縁であった。しかし、抗原解析の結果はA/Hiroshima/52/2005 (H3N2) 株に対して変異していることが示唆され、遺伝子解析の結果とは異なった。このことは抗原性に強い影響を与える抗原決定基のアミノ酸に変異があった結果かもしれない¹⁰⁾。B型ではワクチン株であるビクトリア系統株のB/Malaysia/2506/2004株と近縁であった。国立感染症研究所による平成18年度のインフルエンザウイルスの抗原及び遺伝子解析において、A/H1N1型においては国内分離株の多くはワクチン株類似株であったが、抗原変異株も多く見られていること、A/H3N2型ではワクチン株から抗原性が変異してきていること、B型ではワクチン株であるビクトリア系統株と類似株であると報告している^{8,9)}。遺伝子解析による抗原性解析はワクチン候補株を選択する上でも貴重な情報還元となることから、今後とも継続していく必要があると考えられる。

3・4 薬剤耐性

インフルエンザ治療薬であるリン酸オセルタミビルに対する感受性を調べるため、分離株のNA遺伝子の解析を行ったところ、塩基配列決定を行った55株の全てにおいて、薬剤耐性獲得に必要なアミノ酸変異は見られなかつ

た。従って、リン酸オセルタミビルは平成13年にA及びB型インフルエンザ治療薬として認可、使用されているが、福岡県ではリン酸オセルタミビル耐性株の流行は現在までのところないと考えられた。しかしながら日本よりはるかに使用量の少ないヨーロッパ、アメリカにおいては、ノルウェー251株中167株 (67%)、フランス401株中170株 (42%)、オランダ140株中42株 (30%)、ドイツ507株中65株 (13%)、イギリス331株中35株 (11%)、カナダ454株中107株 (24%)、アメリカ838株中87株 (10%) と、リン酸オセルタミビル耐性株が既に高頻度に検出されている^{3,4,5)}。最近、リン酸オセルタミビルで治療を受けたインフルエンザ患者の体内で薬剤耐性を獲得したウイルスが、家族内で感染したと推測される事例が関東地区で初めて確認された¹¹⁾。これまでのところ日本ではリン酸オセルタミビル耐性株の大規模流行はなく、欧州のような深刻な状況にはなっていないと考えられるが、リン酸オセルタミビル使用量の非常に多い日本において、薬剤の使用量が多くなれば薬剤耐性株の出現が憂慮されている¹²⁾。このことは当県においても薬剤耐性インフルエンザウイルスによる集団感染事例が発生する危険性を示唆しており、今後も薬剤耐性株出現の監視を続けていく必要があると考えられる。

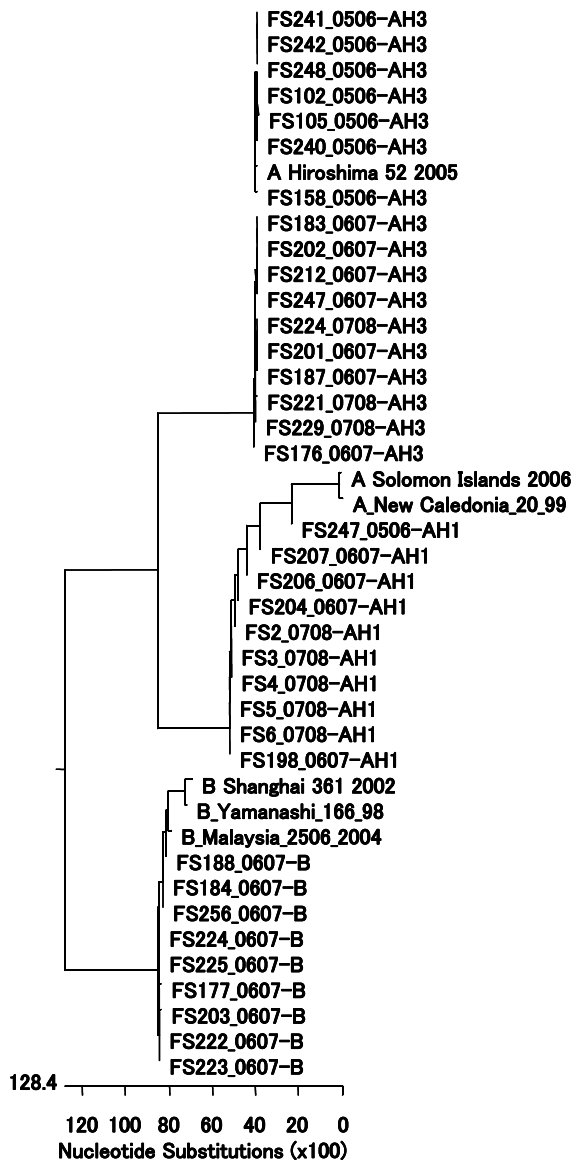


図2 分離されたA及びB型インフルエンザウイルス株のHA遺伝子領域の分子系統樹
塩基配列は「FS」に続く検体番号、流行シーズン並びにA、B型の区別で表記した。分子系統樹は塩基配列をClustalW法で整列後、MEGALIGNにより作成、ブートストラップ法により検定した。

4 まとめ

インフルエンザ流行のピークは平成18年は1月に、平成19年は例年より1ヶ月以上遅く、平成20年は流行そのものが小さかった。インフルエンザ患者より採取された咽頭拭い液等よりMDCK細胞を用いてウイルス分離を行った結果、分離されたインフルエンザウイルス株は平成17

年、18年はA/H3が最も多く、平成19年はA/H1が優位であった。感染研で実施された抗原解析の結果では当所の分離株はワクチン株と比較し抗原性に変異が認められているが、当所で行ったHA遺伝子解析では大きな変異は見られなかった。またノイラミニダーゼ阻害薬に対する耐性をNA遺伝子の解析により行ったところ、薬剤耐性を獲得するような変異は見られなかった。

文献

- 1) Robert G Websterr et al., Microbiological Reviews, 56(1):152-179, 1992.
- 2) Beigel JH et al., New England Journal of Medicine, 353(13):1374-1385, 2005.
- 3) Vasiliy P. Mishin, et at., Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(11), 4515-4520, 2005.
- 4) Arnold S. Monto, et al., Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(7), 2395-2402, 2006.
- 5) Penelope Ward et al., Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, Suppl. S1, i5-i21, 2005.
- 6) 福岡県保健環境研究所ホームページ (<http://www.fihef.pref.fukuoka.jp/>)、福岡県感染症情報、定点当たり報告数(インフルエンザ)
- 7) 病原体検出マニュアル、インフルエンザ、国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会、p853-895、平成15年12月9日
- 8) 病原微生物検出情報、28、313-320、2007.
- 9) 病原微生物検出情報、28、320-322、2007.
- 10) Karoline Bragstad et al., Virology Journal, 5(40)、1-19、2007.
- 11) 横浜市衛生研究所ホームページ (<http://www.city.yokohama.jp/me/kenkou/eiken/news.html>)、平成20年2月29日
- 12) 病原微生物検出情報、29、155-159、2008.

(英文要旨)

Current trends of antigenic and genetic characteristics of influenza viruses isolated in Fukuoka Prefecture between 2005 and 2008

Nobuyuki SERA, Yoshiki ETOH, Shiko NAKAYAMA, Tetsuya ISHIBASHI and Katsumi CHIJIWA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

The antigenic and genetic variation, and drug resistance of influenza viruses isolated in Fukuoka Prefecture between 2005 and 2008 were analyzed. Under the Fukuoka Epidemiological Surveillance of Infectious Diseases, clinically diagnosed influenza cases have first been reported in approximately the middle of December, gradually increase, and continue until April or March during the 3 recent seasons. The total number of reported patients, the peak height and severity of cases depend on the year. Generally, influenza epidemics in Japan have caused by influenza AH3, AH1, and B types. Antigenic analysis showed that the hemagglutinin (HA) antigens of AH1 and AH3 isolated in Fukuoka Prefecture were not very closely related to those of vaccine strains such as A/Solomon Islands/3/2006 or A/New Caledonia/20/99, and A/Hiroshima/52/2005. Phylogenetic analysis of Influenza HA gene showed that the HA genes of AH1 isolates were slightly shifted from those of the vaccine strains, but those of AH3 isolates were genetically similar to that of the vaccine strain. Neuraminidase Inhibitors (NIs) are currently one of the most effective drugs against influenza viruses. Recently, resistant mutants have been reported especially in Europe, and caused a concern that such viral variants may reduce sensitivity to the treatment with NIs. The result indicated that influenza A isolates in Fukuoka prefecture had no resistant mutation in NA gene. However, it is necessary to perform surveillance for the appearance of the drugresistant viruses.

[Key words; Influenza virus, antigenic, genetic, drug resistance]