

## 2011/2012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 佐々木泰子

### 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、2011/2012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

2011年10月から2012年6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372検体（小児科329検体、内科43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℃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℃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またはRD-18S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、型特異的PCR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/Victoria/210/2009 (H3N2)

B/ Brisbane /60/2008 (ビクトリア系統)

B/Bangladesh/3333/2007 (山形系統)

#### 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。

### 3. 結果

#### 3-1 ウイルス分離・検出状況

2011/2012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、2011年12月16日（第50週）採取の咽頭拭い液から分離した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、2012年第4週（1/23～1/29）に16株分離されたのをピークに第15週（4/9～4/15）まで継続的に分離された。その後、第23週（6/4～6/10）まで分離されなかったが、6月16日（第24週）に採取された検体から1株分離された。最終的に、シーズン合計132株分離された。

B型インフルエンザウイルスは、2011年12月26日（第52週）に採取された咽頭拭い液から初めて

分離された。その後、2012年第2週（1/9～1/15）に1株分離された。その後第4週（1/23～1/29）に2株分離されて以降は、第18週（4/30～5/6）まで継続的に分離された。第20週（5/14～5/20）に1株分離されるまで合計69株分離された。

A型インフルエンザウイルス（H1N1）2009は、2012年第1週（1/2～1/8）と第15週に採取された咽頭拭い液から2株分離されたのみであった（図1、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。

2011年10月から2012年6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16株、エンテロウイルス11株、パラインフルエンザウイルス3型1株および単純ヘルペスウイルス1型1株が分離された（表1）。

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	2011/ 10	11	12	2012/ 1	2	3	4	5	6	合計
分離ウイルス / 検体数	17	25	46	80	84	47	35	14	25	373
Influenza A(H1)2009				1			1			2
Influenza A(H3)			15	50	43	22*	2		1	133
Influenza B			1	7	23	15	21	2		69
Adeno 1			2	1						3
Adeno 2		1				1	2		2	6
Adeno 3	1	1	2			1*				5
Adeno 4									1	1
Adeno 6								1		1
Coxsackie A6	2									2
Coxsackie A16	1	1			1					3
Echo 6	2	2	1			1				6
Parainfluenza 3									1	1
Herpes simplex 1			1							1

\* Influenza A(H3)およびAdeno 3の重複感染事例が1検体

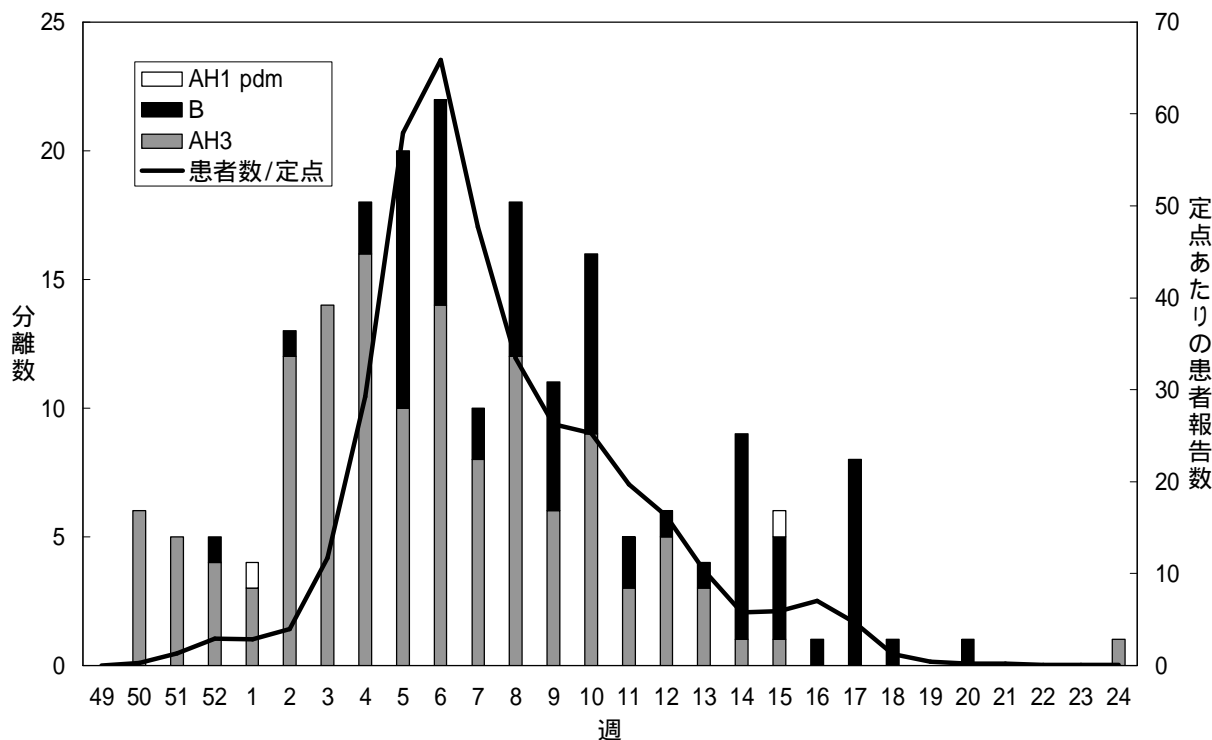


図1 週別インフルエンザ患者報告数とインフルエンザウイルス分離・検出数

### 3-2 分離ウイルスの性状

表2に2011/2012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40~1280と幅があった。

69株分離されたB型ウイルスのうち40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、抗血清(ホモ価1280)に対してHI価は160~1280と幅があったが、大部分(35株)は320~640であった。

B型ウイルス29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80~1280と幅があったが、そのうち22株は320~640であった。

A型インフルエンザウイルス(H1N1)2009分離株2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および2560を示した。

表2 2011/2012 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(H1N1pdm)	A/ Victoria/ 210/2009 (H3N2)	B/ Brisbane/ 60/2008	B/ Bangladesh/ 3333/2007
A/California/7/2009(H1N1pdm)		1280	<10	<10	<10
A/Victoria/210/2009 (H3N2)		<10	2560	<10	<10
B/Brisbane /3/2007		<10	<10	1280	20
B/Bangladesh/3333/2007		<10	<10	20	1280
A/札幌/4/2012(H1pdm)		640	<10	<10	<10
A/札幌/120/2012(H1pdm)		2560	<10	<10	<10
A/札幌/189/2011(H3)		<10	320	<10	<10
A/札幌/5/2012(H3)		<10	80	<10	<10
B/札幌/1/2012		<10	<10	320	20
B/札幌/72/2011		<10	<10	20	640
B/札幌/67/2012		<10	<10	20	160

### 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2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、2株ともにNA遺伝子の H275Y変異は確認されなかった。

### 4. まとめ

2011/2012 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、2011年第51週(12/19~12/25)に定点あたり患者数が1.0を超えてから徐々に増加して、2012年第3週(1/16~1/22)には流行発生注意報の基準値の10を超えた。翌週以降も増加し、第5週(1/30~2/5)には流行発生警報の基準値(30)を超え、翌第6週(2/6~2/12)に65.9となりピークを迎えた。その後、患者報告数は徐々に減少に転じ、第14週(4/2~4/8)には10以下となり(5.7)、

第19週(5/7~5/13)に1未満となって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、6週ほど遅れてB型インフルエンザウイルスが流行し始め、A香港型インフルエンザウイルス(AH3)とB型インフルエンザウイルスが同時期に流行してピークを迎えた。ピークを過ぎても混合流行は続き、シーズン後半には、A香港型インフルエンザウイルス(AH3)が減少して、B型インフルエンザウイルスが主流株となった。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65.2%と分離株の半数を超え、次いでB型ウイルスが33.8%、A型インフルエンザウイルス(H1N1)2009が1.0%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2011年12月に初分離され、それ以降1月後半にピークを迎え、2011年4月まで継続して分離され、最終的には6月まで分離された。2011年1

月末から2月初めにかけてB型インフルエンザウイルスの分離数が急増し、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、2011年内の患者数の増加はA香港型インフルエンザウイルス(AH3)によるものであり、さらに2012年になってからはB型インフルエンザウイルスが加わって流行のピークとな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40~1280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

分離されたB型ウイルスの半数以上(69株中40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、HI価は160~1280と幅があったが、大部分(35株)は320~640であった。

残りのB型ウイルス分離株29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80~1280と幅があったが、そのうち22株は320~640であった。

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と2560を示して、抗原性が大きく変わる株は無かった。

日本は、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、オセルタミビル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A型インフルエンザウイルス(H1N1)2009の分離数は2株のみであり、いずれもオセルタミビル耐性ウイルスではなかった。全国的にも分離数は少なく<sup>1)</sup>、オセルタミビル耐性株も生じていない<sup>2)</sup>。

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) 国立感染症研究所感染症情報センター：インフルエンザウイルス分離・検出状況 2011年第36週(9/5-11)~2012年第25週(6/18-24) (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/1974-idsc/iasr-flu/2458-iasr-influ20120719.html>)
- 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：抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2012年8月3日 (<http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/2068-flu/flu-dr/2491-flu-dr20120803.html>)