

東京都におけるインフルエンザの流行状況（2008/2009シーズン）

原田 幸子, 新開 敬行, 長島 真美, 吉田 勲, 尾形 和恵, 保坂 三継, 甲斐 明美

Viral Investigation of Influenza Epidemics in Tokyo

(2008/2009 season)

Sachiko HARADA, Takayuki SHINKAI, Mami NAGASHIMA, Isao YOSHIDA, Kazue OGATA,
Mitsugu HOSAKA and Akemi KAI

[正誤表 Errata]

東京健安研七年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 60, 67-72, 2009

東京都におけるインフルエンザの流行状況 (2008/2009シーズン)

Viral Investigation of Influenza Epidemics in Tokyo
(2008/2009 season)

71ページ 文献

[誤 Error]

- 3) 新開敬之, 貞升健志, 長島真美, 他 : 東京健安研七年報, 58, 67-72, 2007.

[正 Correct]

- 3) 新開敬行, 貞升健志, 長島真美, 他 : 東京健安研七年報, 58, 67-72, 2007.

東京都におけるインフルエンザの流行状況 (2008/2009シーズン)

原田 幸子*, 新開 敬行*, 長島 真美*, 吉田 勲*, 尾形 和恵*, 保坂 三継*, 甲斐 明美**

2008/2009シーズンに東京都の感染症発生动向調査事業により病原体定点病院から搬入されたインフルエンザ疑いの患者検体287件について、遺伝子検査(PCR)およびウイルス分離試験を行った。その結果、遺伝子検査によりA/H1亜型108件, A/H3亜型57件, B型59件が検出され、分離試験ではA/H1亜型38件, A/H3亜型20件, B型43件が検出された。これら流行株のワクチン株との類似性を調べた結果、A/H1亜型, A/H3亜型で類似性が見られたが、B型ではワクチン株との類似性は見られなかった。

キーワード: 病原体定点医療機関, インフルエンザウイルス, 遺伝子解析, ウイルス分離試験

はじめに

東京都では感染症発生动向調査事業として都内に定点医療機関を定め感染症の監視を行っている。健康安全研究センターでは、各定点医療機関から提供された検体について患者情報および病原体情報の収集、分析を行うとともに病原体定点医療機関から搬入された検体について病原体検索を行い¹⁾、関係機関への情報提供ならびにホームページ等を利用して情報公開を行っている。インフルエンザ病原体定点は都内に14ヶ所設置され、当センターに搬入された患者検体からMultiplex RT-nested PCR法²⁾を用いた遺伝子検査および株化細胞 (MDCK: イヌの腎臓細胞, HEp-2: ヒト喉頭癌細胞) を用いたウイルス分離試験によりウイルス検索を行っている。本稿ではインフルエンザ定点医療機関より搬入された、2008/2009シーズン (2008年9月から2009年6月まで) のインフルエンザ疑い検体 (咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液) からウイルス検索を行い、得られた結果から都内の流行状況を検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

2008年9月から2009年6月までに14ヶ所のインフルエンザ病原体定点医療機関においてインフルエンザ様症状を呈する患者から採取した咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液計287件を試料として用いた。

2. 遺伝子検査

ウイルスRNAは、咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液100 μ L から核酸抽出剤 (SepaGeneRV-R, 三光純薬) を用いて抽出を行った。抽出した核酸は20 μ L の精製水で浮遊させRNA 試料とした。インフルエンザウイルスAH1 亜型, AH3 亜型, B 型のHA 遺伝子領域 (566 アミノ酸) の一部遺伝子を各型に特異的なプライマーを用いたMultiplex RT-nested PCR 法により増幅した。使用したプライマーおよび反応条件は2007年に報告した方法に従い、同様のプラ

イマーおよび条件で遺伝子の増幅を行った³⁾。遺伝子の増幅後、この産物を2.5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、標的とした断片の有無によりウイルス核酸検出の確認および判別を行った。

3. 遺伝子解析

PCR 法により標的断片の存在が確認された増幅産物は、2.5%の低融点アガロースゲルにて電気泳動し、至適泳動位置の核酸バンドのみを紫外線照射下で切り出し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて核酸の精製を行った。この核酸をDye Terminator 法によるCycle Sequencing 反応にて処理し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (ABI) を用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。得られた塩基配列のうち、AH1亜型では171塩基、AH3亜型では309塩基、B型では201塩基をアミノ酸配列に置換後、ワクチン株および近年流行ウイルス株のアミノ酸配列より作成した遺伝子系統樹を用いて2008/2009シーズンに検出された流行株の抗原解析に供した。

4. ウイルス分離試験

咽頭ぬぐい液および鼻腔ぬぐい液を攪拌後、24wellプレートに単層培養した株化細胞 (MDCK, HEp-2) に接種した。MDCK 細胞にはトリプシンを添加した最少必須培地 (MEM) を、HEp-2 細胞には1%牛胎児血清を添加したMEM を用いて37度の炭酸ガスふ卵器で培養し、細胞変性効果 (cyto pathic effect: CPE) の有無を確認した。1週間を1継代期間として計3代の培養を行った。CPEを確認したwellは接地した細胞および変性した細胞をはがし、2mLのセラムチューブに回収後、抗原解析を行った。

5. HI同定試験による抗原解析

CPEの認められた検体または3継代期間の培養が終了した検体は、常法に従いモルモット赤血球を用いた凝集反応 (HA) にて細胞培養上清中のウイルスの有無を確認した。

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部

凝集を確認したウイルス株は、国立感染症研究所配布の2008/2009シーズン用インフルエンザサーベイランスキット⁴⁾(H1: A/Brisbane/59/2007, H3: A/Uruguay/716/2007, B: B/Florida/4/2006, 参照株として, B/Malaysia/2506/2004も使用。)ならびにデンカ生研製ワクチン株抗血清を用いて赤血球凝集抑制(HI)試験により抗原解析を行った。

結 果

1. インフルエンザウイルスの検出状況

2008/2009シーズンにPCR検査にて検出されたインフルエンザウイルスはA/H1N1型108件, A/H3N2型57件, B型59件であった(表1)。最初に確認されたインフルエンザウイルスはB型であり, 2008年38週(9月)に搬入された2件であった(図1)。

A/H3N2型が最初に確認されたのは, 第46週(11月)に搬入された4件のうちの2件であった(図1)。一方A/H1N1型が最初に確認されたのは, 第48週(11月)であり, 4件搬入されたうちの1件であった(図1)。A/H3N2型およびA/H1N1型はともに48週以降も継続して検出されたが, その後A/H1N1型の発生が優勢となり, シーズンを通しての主な流行型はA/H1N1型となった(図1)。

インフルエンザ検体の搬入数は年明けから急激に増加した(図1, 表1)。検体数および検出数の急増から流行のピークは第6週(2月)であり, 第6週を境に急激に検体数は減少し, 以後小流行を繰り返した(図1)。また, A/H1N1型とA/H3N2型の発生比率から両者の流行ピークは同一時に発生していることが判明した(図1)。また, B型のピークは第10週(3月)から第16週(4月)とA型型に比べ遅い時期となった。2008/2009シーズンの流行は第16週以降も小ピークが出現し, 流行が長期に継続したことが判った(図1)。

2. 遺伝子解析結果

HA遺伝子の一部分の塩基配列を決定し, その後アミノ酸に変換した流行株や今季ワクチン株および歴代の分離株を用いて系統樹を作成した。系統樹解析の結果, 2008/2009シーズンのA/H1N1型流行株は本シーズンのワクチン株であるA/Brisbane/59/2007株の系統に属しているものの, 3ク

ラスター程右側にスライドした位置にクラスターを形成していた(図2)。

A/H3N2型流行株は, 本シーズンのワクチン株であるA/Uruguay/716/2007を含む大きな枝に含まれていたが, ワクチン株に比べアミノ酸が3個異なり遺伝学的には別のクラスターを形成していた(図3)。

B型流行株は, 本シーズンのワクチン株であるB/Florida/4/2006(B/山形系統)とは異なる系統のウイルス(B/Victoria系統)であった。また, Victoria系統株であっても分離株のクラスターは大きく二つに分かれ, 異なるクラスターを形成した。そのうちの一方は参照株である, B/Malaysia/2506/2004と近縁な位置にクラスターを形成し, 他方は参照株とも異なるクラスターを形成した(図4)。

3. 分離試験結果

ウイルス分離試験の結果, A/H1N1型38件, A/H3N2型20件, B型43件が検出された。

分離されたウイルスはHA試験によりウイルスの確認およびHA価の測定を行い, ワクチン株抗血清を用いたHI試験によって血清型を決定した。

その結果, 本シーズンに分離されたA/H1N1型分離株はワクチン株であるA/Brisbane/59/2007(H1N1)株抗血清(ホモHI価80倍)に対して10~40倍のHI価を示した株が45.2%であった。また, 80~2560倍のHI価を示した株が54.8%であった。

A/H3N2型分離株はワクチン株であるA/Uruguay/716/2007(H3N2)株抗血清(ホモHI価320倍)に対して, 10~20倍のHI価を示した株が53.8%を占め, 80~640倍のHI価を示した株が46.2%となった。

B型分離株ではワクチン株であるB/Florida/4/2006(B/山形系統)株抗血清(ホモHI価160倍)に対して, 全ての株が10倍以下のHI価であった。一方, 参照株であるB/Malaysia/2506/2004(B/Victoria系統)株抗血清(ホモHI価160倍)に対しては全ての株が10~40倍のHI価を示した。

表1. PCR法により検出されたインフルエンザウイルス (2008/2009シーズン)

	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	合計
A/H1N1	0	0	1	7	41	49	6	3	1	0	108
A/H3N2	0	0	5	10	17	12	4	5	4	0	57
B	2	2	1	0	1	9	20	16	8	0	59
総検体数	11	7	15	24	68	76	35	27	18	6	287

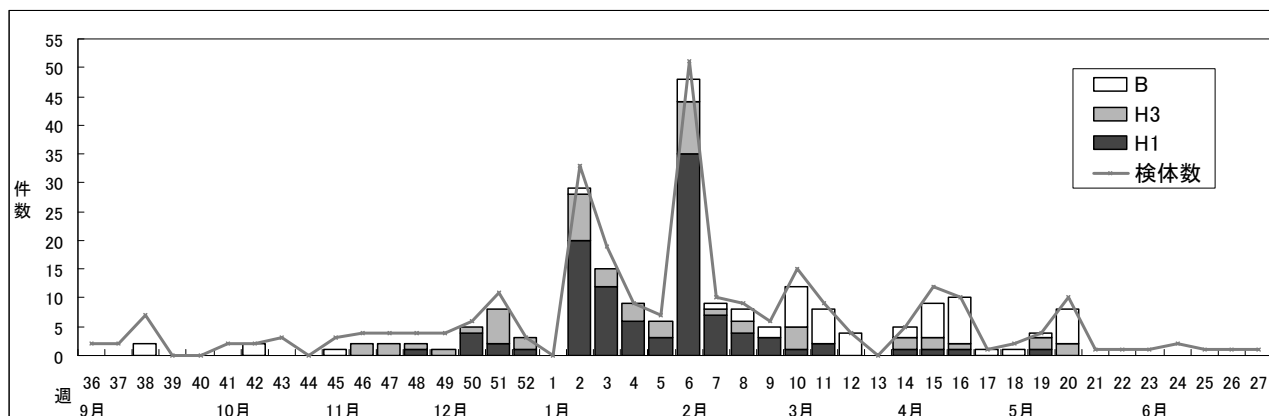


図1. 週別インフルエンザ検体数およびウイルス型別検出数の推移 (2008/2009シーズン)

考 察

1. インフルエンザウイルスの検出状況

2008/2009シーズンの都内におけるインフルエンザウイルスの流行状況は、第2週と第6週に2つのピークがあり、その前後に小流行が見うけられたことから、主たる流行期間としては2008年第45週から2009年第20週であり、その他は地域流行や散発発生による流行が継続されていたものと考えられる。

月別検体数を示した表1から、1月の総検体数は12月の2.5倍以上になっており、2月は3倍以上となったことから、本シーズンの流行ピークは1月ならびに2月の2ヶ月であり、患者報告数からみたピークとの比較(時期, ピーク時期)から、流行の最大ピークは2月であったことが示唆される。

2. 遺伝子解析

インフルエンザウイルスが宿主細胞に感染する際に、HAたんぱく質が細胞表面のシアル酸で構成されるレセプターのリガンドとなることから、HA遺伝子の変異によって抗原性が変化する性質が知られている⁵⁾。2008/2009シーズンのAH1亜型株についての系統樹解析の結果では、ワクチン株であるA/Brisbane/59/2007に対し、やや離れた位置にクラスターを形成した(図2)。このことは本シーズンの流行株が、ワクチン株とは遺伝的に同一系統ではあるが、相同性が低下した株であったことがわかる。一方、抗原力価を示すHI価では54.8%の株が高いHI価を示し、45.2%の株で低いHI価を示したことから、ワクチン株との交差反応性が高い株がわずかに優勢であったことがわかった。また、系統樹上に示された株の位置関係を比べてみると系統樹ではクラスターの大半を占めるクレードA(3つのクレードの中でワクチン株と近い距離にある)でワクチン株に対する高HI価の株が68.8%存在していたことから、遺伝的差異とHI価には相関傾向があることが推察された(図2)。一方、クレードB(3つのクレードの中でワクチン株と中程度の距離にある)では83.3%の株がワクチン株に対する低HI価を示した。同様の傾向がクレードC(3つのクレードの中でワクチン株と遠い

距離にある)でも認められるが、クレードCでは解析に使用可能な株が3株と少なく評価に供することはできなかった。以上のことから、2008/2009シーズンの流行株はワクチン株であるA/Brisbane/59/2007の類似株と、抗原性に変異がある株が入り混じった流行であったと考えられた。

なお、2009年6月に南半球で罹患したと思われる患者から検出されたAH1亜型株を遺伝子情報に基づき流行株と同様に系統樹解析した結果、前記したクレードBに属し、ワクチン株に対するHI価も同様であったことが認められた(原田:未発表)。このことから、2009-10シーズンに流行する可能性のあるA/H1株はワクチン株であるA/Brisbane/59/2007株とは抗原性が異なる株である可能性が高いことが予想される。

A/H3亜型流行株についての系統樹解析では、ワクチン株であるA/Uruguay/716/2007株を含む大きなクラスターに属していた(図3)。このクラスターを精査すると、細かくいくつものクレードに分かれるが、ワクチン株に対するHI試験の結果を見ると46.2%がワクチン株であるA/Uruguay/716/2007に高いHI価を示し、53.8%が低いHI価を示したものの系統樹では特定のクレードに特化しないことから、A/H3亜型の2008/2009シーズンの流行株はワクチン株であるA/Uruguay/716/2007株と近縁ではあるが、類似性が低下しつつある株であることが考えられる。

一方、B亜型ではワクチン株がB/Florida/4/2006(B/山形系統)株であるのに対して、本シーズンに流行が見られたB亜型ウイルスはB/Victoria系統株であることが系統樹解析ならびにHI試験から判明している。系統樹解析では、検出された株のすべてがB/Victoria系統に属し、流行株の中でも大きく2つのクレードを形成した。流行の大部分はB/Malaysia/2506/2004(B/Victoria系統)を含まないクレードBに属し(図4)、一部がB/Malaysia/2506/2004(B/Victoria系統)を含むクレードAに属した(図4)。また、流行株のHI試験の結果からも明らかにワクチン株であるB/Florida/4/2006(B/山形系統)とは交差反応性がなく、系統樹上でも異なる系統に位置しており、系統樹解析の結果と一致していた。

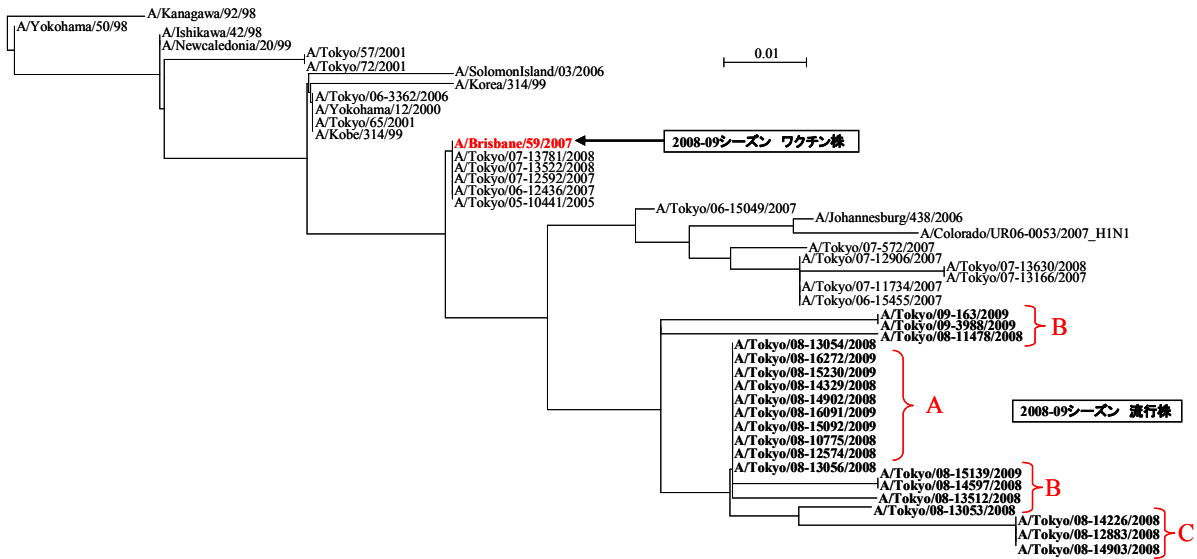


図2. 東京都におけるAH1型インフルエンザウイルスのHA遺伝子系統樹 (2008/2009シーズン)

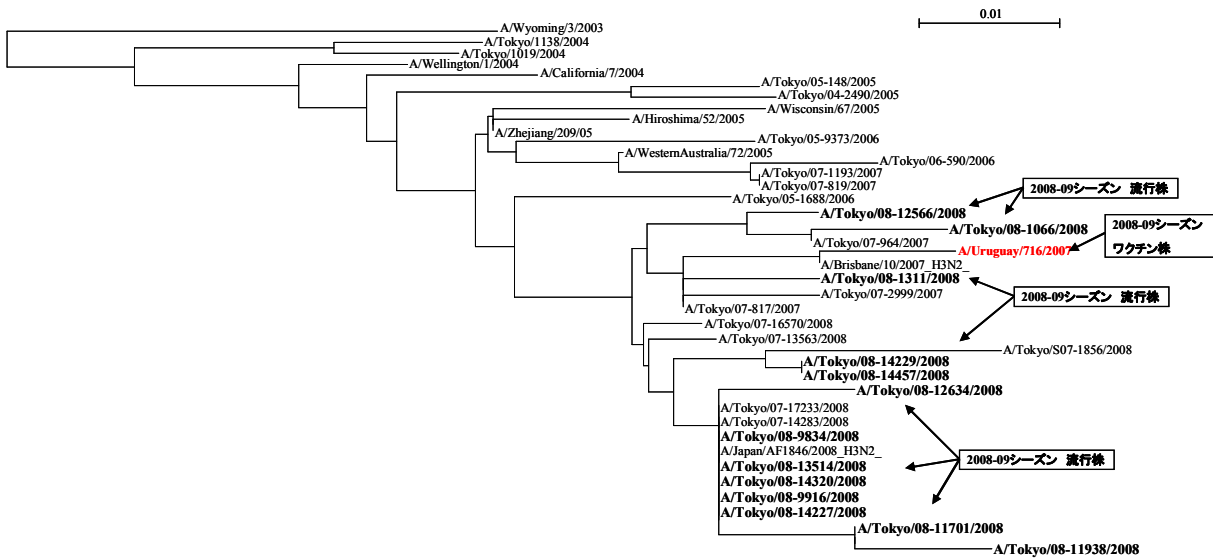


図3. 東京都におけるAH3型インフルエンザウイルスのHA遺伝子系統樹 (2008/2009シーズン)

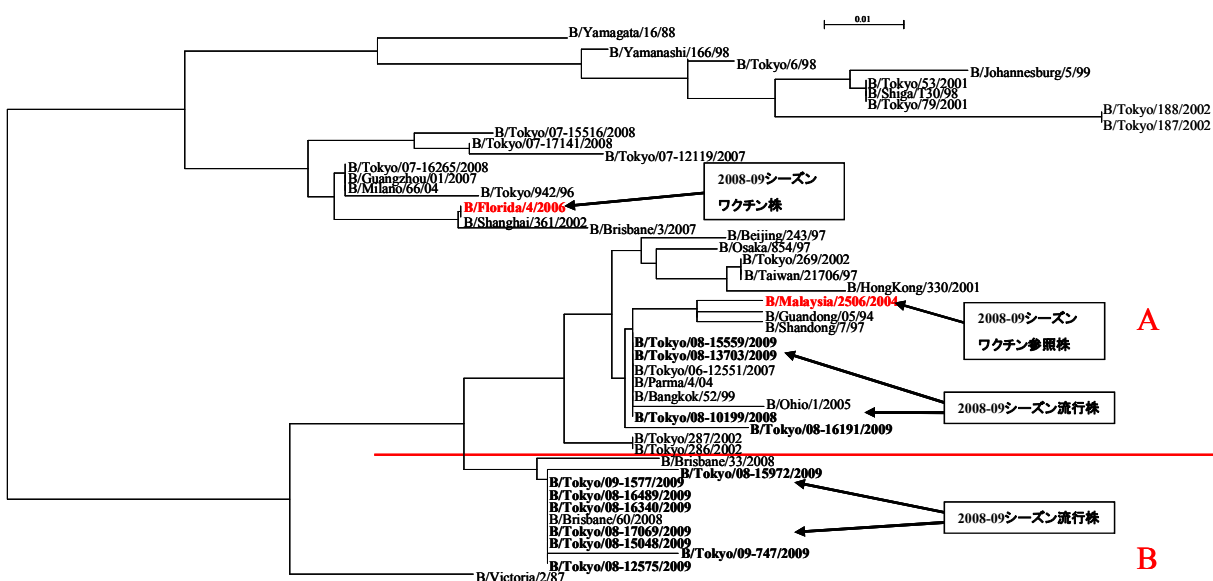


図4. 東京都におけるB型インフルエンザウイルスのHA遺伝子系統樹 (2008/2009シーズン)

さらに、B/Malaysia/2506/2004 (B/Victoria系統) 株抗血清とのHI価は全ての株で低い値となっていた。これは流行した株の大部分がB/Malaysia/2506/2004 (B/Victoria系統) を含まないクラスターBに属することと関係しているものと考えられる。また、その他の株についても低いHI価であったことから、本シーズンのB型株はワクチン参照株とも類似性の低い株であることがわかった。

ま と め

2008/2009シーズンのインフルエンザの流行は、2008年9月に始まり、2009年5月までの9ヶ月間続いた。流行のピークは1月、2月の2ヶ月間であり、流行型はAH1亜型、AH3亜型、B型の3種類のウイルスであり、AH1亜型の流行が主であった。遺伝子解析ならびにワクチン株抗血清を用いたHI試験による抗原解析を行った結果、AH1亜型流行株はワクチン類似株と抗原性に変異がある株が入り混じった流行であったことが判明した。AH3亜型流行株では、ワクチン株と近縁ではあるが、類似性が低下しつつある株であるこ

とが判明した。B型流行株では、ワクチン株 (B/山形系統) とは系統が異なるB/Victoria系統であったことから、ワクチン株とは交差反応性がなく、系統樹上でも異なる系統に位置していること、またワクチン参照株 (B/Victoria系統) と類似性の低い株であることが判明した。

文 献

- 1) 感染症発生動向調査事業報告書 平成19年(2007年).
- 2) Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.: *Briefings in Bioinformatics*, **5**, 150-163, 2004.
- 3) 新開敬之, 貞升健志, 長島真美, 他: 東京健安研七 年 報, 58, 67-72, 2007.
- 4) 2008/2009シーズンインフルエンザワクチン株.
<http://idsc.nih.go.jp/vaccine/atopics/atpcs002.html>
(2009年8月1日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) 吉倉廣, 豊田哲也, ワンポイントウイルス学, 112-114, 2001, 南洋堂, 東京.

**Viral Investigation of Influenza Epidemics in Tokyo
(2008/2009 season)**

Sachiko HARADA^{*}, Takayuki SHINKAI^{*}, Mami NAGASHIMA^{*}, Isao YOSHIDA^{*}, Kazue OGATA^{*},
Mitsugu HOSAKA^{*} and Akemi KAI^{*}

We performed genetic analysis and virus isolation on 287 clinical samples that had been collected by the surveillance system in Tokyo during the 2008/2009 season. Genetic examination by multiplex RT-PCR detected 108 influenza virus type A subtype H1, 57 type A subtype H3, and 59 type B. The corresponding numbers of these influenza viruses detected by a cell culture method were 38, 20, and 43. On the basis of the results of a genealogical tree analysis and an HI test, we discuss the similarity between vaccine virus strains and the virus strains isolated during the 2008/2009 season.

Keywords: sentinel for infectious agent surveillance, influenza virus, genetic analysis, virus isolation test

^{*} Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan