

[ノート]

兵庫県における 2007/08 シーズンのインフルエンザウイルス 分離株の性状解析

押部 智宏^{1*} 山岡 政興^{1**} 稲元 哲朗¹ 岡藤 輝夫² 芥川 宏³ 近平 雅嗣¹

Antigenic and Genetic Characters of the Epidemic Influenza Viruses in 2007/08 Season of Hyogo Prefecture , Japan.

Tomohiro OSHIBE^{1*}, Masaoki YAMAOKA^{1**}, Tetsuro INAMOTO¹, Teruo OKAFUJI²,
Hiroshi AKUTAGAWA³ and Masatsugu CHIKAHIRA¹

¹*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

²*Okafuji Pediatric Clinic* ³*Hyogo Prefectural Tsukaguchi Hospital*

In the season of 2007/2008, fifty one (78%) of 65 isolates of influenza in Hyogo prefecture were type AH1. However, the dominant type AH1 were replaced by type AH3 after April, 2008. Not a few number of type B were also isolated sporadically through the epidemic season.

Forty three (84 %) of 51 type AH1 isolates showed reduced HI titers with antisera of A/Solomon Islands/3/2006, adopted to the component of 2007/08 influenza vaccine. HA gene phylogenetic analysis found two definitely different type viruses, both of which were different from A/Solomon Islands/3/2006 strain.

All of nine type AH3 isolates were antigenetically similar to A/Hiroshima/52/2005, adapted to the component of 2007/08 influenza vaccine. However, genetically all isolated strains differ from the A/Hiroshima/52/2005 strain.

I はじめに

インフルエンザは毎年冬季に幼児や児童を中心に流行する急性の呼吸器感染症であり、通常は約1週間で軽快する。しかし高齢者や気管支喘息などの基礎疾患を持つ場合は、肺炎等を併発して死に至ることがある。この原因であるオルソミクソウイルス科のインフルエンザウイルスは、その内部蛋白の抗原性からA, B, Cの3つの型に分類され、A型はさらにウイルス表面にある血球凝集素 (HA) 蛋白の抗原性の

違いにより H1 から H16 まで 16 亜型に分類される。このうちヒトで流行するのは、AH1 型 (A ソ連型)、AH3 型 (A 香港型) 及び B 型であり、AH3 型はほぼ毎年流行を繰り返している。

今回、我々は 2007/08 シーズンに兵庫県内で流行したインフルエンザウイルスの性状を把握することを目的として、県内の患者からインフルエンザウイルスを分離して、同定、抗原解析及び遺伝子解析を行い、過去の県内の流行株と比較検討したので報告する。

II 材料と方法

1. インフルエンザウイルスの分離材料

2007年11月～2008年6月に姫路市及び尼崎市の小児科医療機関の2定点において採取された咽頭ぬぐ

¹感染症部 ²岡藤小児科医院 ³兵庫県立塚口病院
*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29

兵庫県立健康環境科学研究所センター

感染症部 押部 智宏

** 現 神戸大学医学部

い液118検体, 及び4つの学校施設等のインフルエンザを疑う集団発生事例で採取された咽頭ぬぐい液11検体, 合計129検体を分離材料として供試した。

2. インフルエンザウイルス株

2007/08シーズンに分離されたウイルス株との比較に県内で分離された, 2001/02, 2002/03, 2005/06, 2006/07シーズンのAH1型ウイルス24株, 2001/02から2006/07シーズンのAH3型ウイルス株37株を供試した。

3. インフルエンザウイルスの分離

採取した咽頭ぬぐい液をMDCK細胞に接種し, トリプシン存在下で5%CO₂の条件で33℃, 7日間培養し, 2代盲継代した. 細胞変性効果がみられた培養上清は, 0.75%モルモット赤血球を用いて赤血球凝集 (HA) 試験を行った¹⁾.

4. インフルエンザウイルス株の同定及び抗原解析

AH1, AH3型及びB型系統型別の同定及び抗原解析は, 国立感染症研究所より分与された以下の感染フェレット抗血清であるA/Solomon Islands/3/2006 (AH1型), A/Hiroshima/52/2005 (AH3型), B/Shanghai/361/2002 (B型), 山形系統, B/Malaysia/2506/2004 (B型), Victoria系統により赤血球凝集抑制 (HI) 試験を行った²⁾.

5. インフルエンザウイルス株の遺伝子解析

RT-PCR法により増幅した産物についてダイレクトシーケンス法によりHA1遺伝子の一部の領域 (AH1型は617塩基 (354番目~970番目), AH3型は618塩基 (370番目~987番目)) の塩基配列を決定してCLASTLWソフトウェアにより系統樹解析を行った。

III 結果および考察

1. ウイルス分離状況

2007/08 シーズンの月別インフルエンザウイルスの分離数を Table 1 に, また Fig. 1 に当研究センターでのインフルエンザウイルス分離数と定点医療機関当たりのインフルエンザ患者報告数を週別に示した。

2007/08 シーズンは, 129 検体中 65 株のウイルスが分離され, 分離率は 50%であった. このうち A 型では AH1 型が 51 株 (78%), AH3 型が 9 株 (14%), B 型では山形系統が 4 株 (6%), Victoria 系統が 1 株 (2%) であった. 全国の分離状況をみると AH1 型が 3,644 株 (86%), AH3 型が 349 株 (8%), B 型が 239 株 (6%) で³⁾, 県内と同様に AH1 型, AH3 型及び B 型が混合流行し, その主体は AH1 型であった。

Table 1 Monthly isolation of influenza viruses in Hyogo prefecture during 2007/08 season.

Sampling period		Sample	Isolate			Total	Rate of isolation (%)
Year	Month		AH1	AH3	B		
2007	11	21	12	0	0	12	57
	12	21	9	0	0	9	43
2008	1	14	9	0	1	10	71
	2	29	14	1	0	15	52
	3	17	7	1	3	11	65
	4	14	0	7	0	7	50
	5	6	0	0	1	1	17
	6	7	0	0	0	0	0
Total		129	51	9	5	65	50

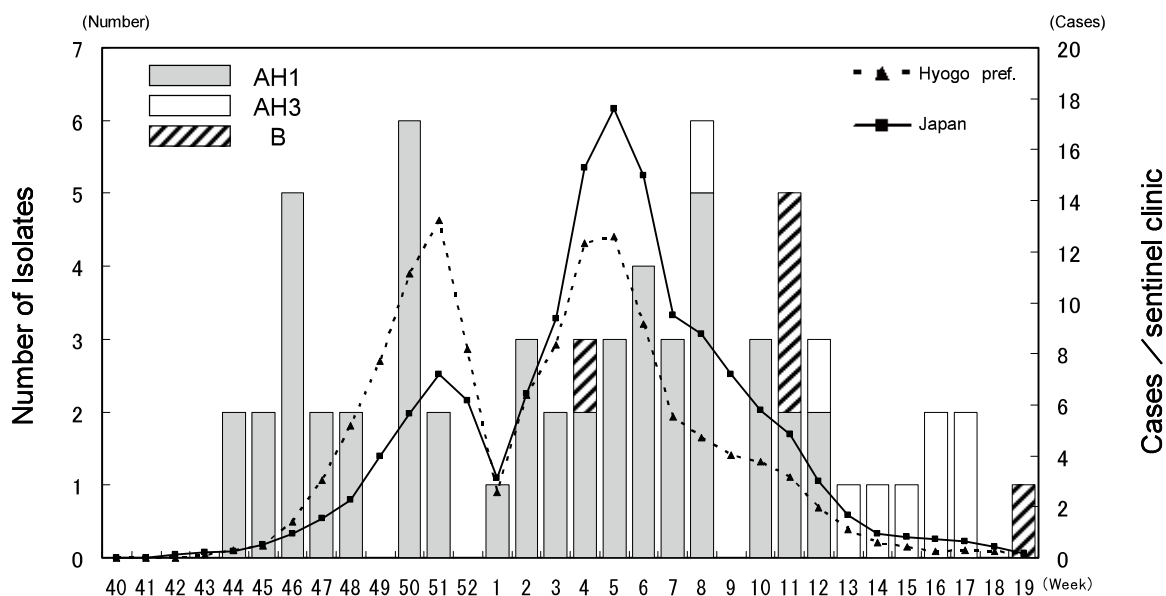


Fig.1 Weekly cases of influenza and isolation of influenza viruses in Hyogo prefecture during 2007/08 season.

AH1 型は 2004/05 シーズンから 4 シーズン連続して流行したが、2006/07 シーズンの後半になるとそれまで少なかった分離数が増加し、2007/08 シーズンになると、その当初では流行初期からこれが主体を占めていた。

2007 年 11 月 7 日に 2007/08 シーズン初のインフルエンザウイルス (AH1 型) が分離され、これは加古川健康福祉事務所管内で集団感染した幼稚園の 4 歳児からであった。AH1 型は 2007 年 44 週～2008 年 12 週の間、継続して分離されたことから、定点からの患者報告数の 2007 年 51 週 (13.23 人)、2008 年 5 週 (12.6 人) の 2 つのピークを形成して流行したウイルスの主体は AH1 型であると考えられた。しかし、その後分離数は減少し、13 週以降は分離されなくなった。これに代わって、AH3 型が 2008 年 8 週に姫路市で家族内感染し定点医療機関に受診した 4 歳児から初めて分離され、12 週から 17 週に 8 株分離されている。B 型は 2008 年第 4 週に尼崎市の定点医療機関に受診した 5 歳児から初めて分離され、Victoria 系統であった。

2. 分離株の抗原解析

2007/08 シーズンに兵庫県内で分離されたインフルエンザウイルス株の抗原解析の結果を Table 2 に示した。

2007/08 シーズンのワクチン株である A/Solomon Islands/3/2006 (AH1 型) の抗血清による HI 試験では、県内で分離された 51 株は、抗血清と同じ抗原を用いた HI 価 (ホモ HI 価) との差が 2 倍以内であった株が 2 株、4 倍は 6 株であったが、8 倍以上と大きく抗原性の異なる変異株が 43 株で 84% と大半を占めた。また、データを示していないが、シーズン後半になるとさらに差が広がり抗原変異の程度が顕著になる傾向がみられた。これらの結果から、今シーズンの県内における AH1 型流行株の多くが抗原変異株であったと考えられ、このことが流行の主体となった要因の一つと推察された。

2007/08 シーズンのワクチン株である A/Hiroshima/52/2005 (AH3 型) の抗血清による HI 試験では、県内分離株の 9 株は、ホモ HI 価との差が 2 倍以内であった株が 8 株で最も多く、4 倍が 1 株で 8 倍以上はなかった。これらの結果から県内の AH3 型の流行株の多くは A/Hiroshima/52/2005 類似株と考えられた。

B 型の山形系統の分離株 4 株は、ワクチン株である B/Shanghai/361/2002 の抗血清による HI 試験で 2 倍以内であったのが 1 株、4 倍が 1 株で、8 倍以上が

Table 2 Hemagglutination inhibition tests of isolates to the reference antisera

Type	Multiple number of HI titers against the reference antisera*			Total
	≤2-fold	4-fold	≥8-fold	
AH1	2	6	43	51
AH3	8	1	0	9
B (Yamagata lineage)	1	1	2	4
B (Victoria lineage)	0	0	1	1

* The reference antisera is: anti-A/Solomon Island/3/2006 ferret serum (AH1), anti-A/Hiroshima/52/2005 ferret serum (AH3), anti-B/Shanghai/361/2002 ferret serum (B, Yamagata lineage), anti-B/Malaysia/2506/2004 ferret serum (B, Victoria lineage)

2 株であった。また、Victoria 系統の分離株 1 株は、ワクチン株である B/Malaysia/2506/2004 の抗血清による HI 試験で 8 倍であった。

3. AH1 型分離株の遺伝子解析

AH1 型分離株の HA 遺伝子について系統樹解析した結果を Fig. 2 に示した。

AH1 型の分離株は 2001/02～2006/07 シーズンのワクチン株である A/New Caledonia/20/1999 に対して Y252F のアミノ酸置換を持つ群 (Group 1) と R145K, R208K 及び T266N の置換を持つ群 (Group 2) に分類された。Group 1 には 2004/05 シーズンの株と 2005/06 シーズンの大半の分離株 (8 株/10 株) が属しており、Group 2 には A/Solomon Islands/3/2006, 2008/09 シーズンのワクチン株である A/Brisbane/59/2007, 2005/06 の一部の株 (2 株/10 株) 及び 2006/07, 2007/08 シーズンの全ての分離株が属していた。Group 2 はさらに R188K 及び E273K の置換を持つ亜群 (Group 2.1), R188M, A189T 及び T193K の置換を持つ亜群 (Group 2.2) 及びこれら亜群の置換を持たない亜群 (Group 2.3) に分類された。

Group 2.1 は、A/Brisbane/59/2007 や 2006/07 シーズンの株の一部 (8/10 株) 及び 2007/08 シーズンの株の一部 (10/22 株) が属していた。さらに Group 2.1 に属する 2006/07 シーズンの 4 株が E169K の置換を伴っていた。また、A/Brisbane/59/2007 及び 2007/08 シーズンの全ての株は K145R の置換を持っていた。

Group 2.2 は、2006/07 シーズンの株の一部 (2/10 株) 及び 2007/08 シーズンの株の半数以上 (12/22 株) が属していた。さらに Group 2.2 に属する 2007/08 シーズンの全ての分離株は N244S の置換を持ち、このうち 3 株は D186N の置換もあった。

Group 2.3 は、2005/06 シーズンの一部 (2/10 株) と A/Solomon Islands/3/2006 が属していた。

これらの系統樹解析の結果から、2007/08 シーズンの分離株の大半は A/Solomon Islands/3/2006 とは

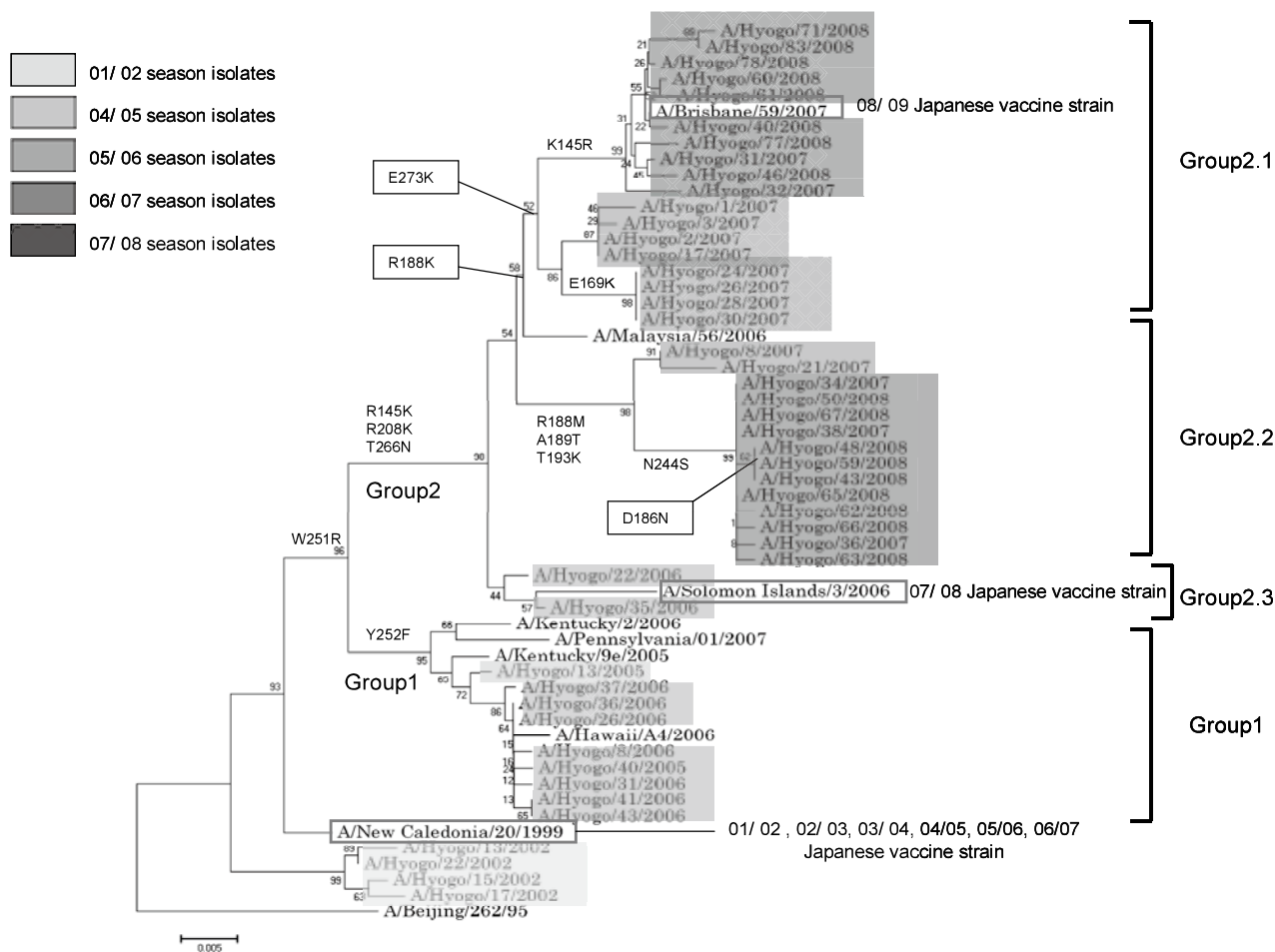


Fig.2 Phylogenetic analysis of influenza AH1 HA genes in Hyogo prefecture.

異なる群に属していたが、その一部は Group 2.1 に属しており、遺伝学的にも A/Brisbane/59/2007 と近縁であることが明らかとなった。

これらの解析に加えて、A/New Caledonia/20/1999 の抗原変異株に多くみられる HA 蛋白の抗原領域 B の K140E の置換⁴⁾は、2001/02~2006/07 シーズンの分離株にはみられなかったが、2007/08 シーズンにこれが大半の株 (21/22 株) で認められ、残りの 1 株 (A/Hyogo/63/2008) は K140G の置換であった。この株は A/Solomon Islands/3/2006 (ホモ HI 価 1:640) に対して HI 価が 1:10 であり、他の 21 株と比較して抗原性がさらに変異していたことから、この抗原性の変異に K140G の置換が関与していることが考えられた。

4. AH3 型分離株の遺伝子解析

AH3 型分離株の HA 遺伝子について系統樹解析した結果を Fig. 3 に示した。

2001/02 シーズンの AH3 型の分離株は、2001/02~2003/04 シーズンのワクチン株である A/Panama/2007/1999 に対して R222W, I202V の置換を持つ群と

S199P, K173E の置換を持つ群に分類できた。

2002/03 シーズンの分離株は A/Panama/2007/1999 に対して H155T, A131T 置換が認められ、さらにこれには Q156H 置換を持つ 4 株と持たない 1 株 (A/Hyogo/151/2002) があつた。

2003/04 シーズンは、A/Panama/2007/1999 に対して H155T, A131T 及び Q156H の置換を持つ前シーズンと同じ群に 1 株 (A/Hyogo/27/2004) が属し、その他の 5 株は 2004/05 シーズンのワクチン株である A/Wyoming/3/2003 に対して S189N, Y159F 及び S227P の置換を有していた。

2004/05 シーズンの分離株は、2005/06 シーズンのワクチン株の A/New York/55/2004 と同じ群に属し、基準株の A/Wellington/1/2004 に対して V226I, K145N の置換及び R173K, R201K の置換を持つ群に属していた。

2005/06 シーズンの分離株は、A/New York/55/2004 に対して S193F, D225N の置換を持ち、K310R, A198T の置換をもつ群 (2/4 株) と持たない群 (2/4 株) に分類された。

2006/07 シーズンの分離株は K140I の置換を持つ

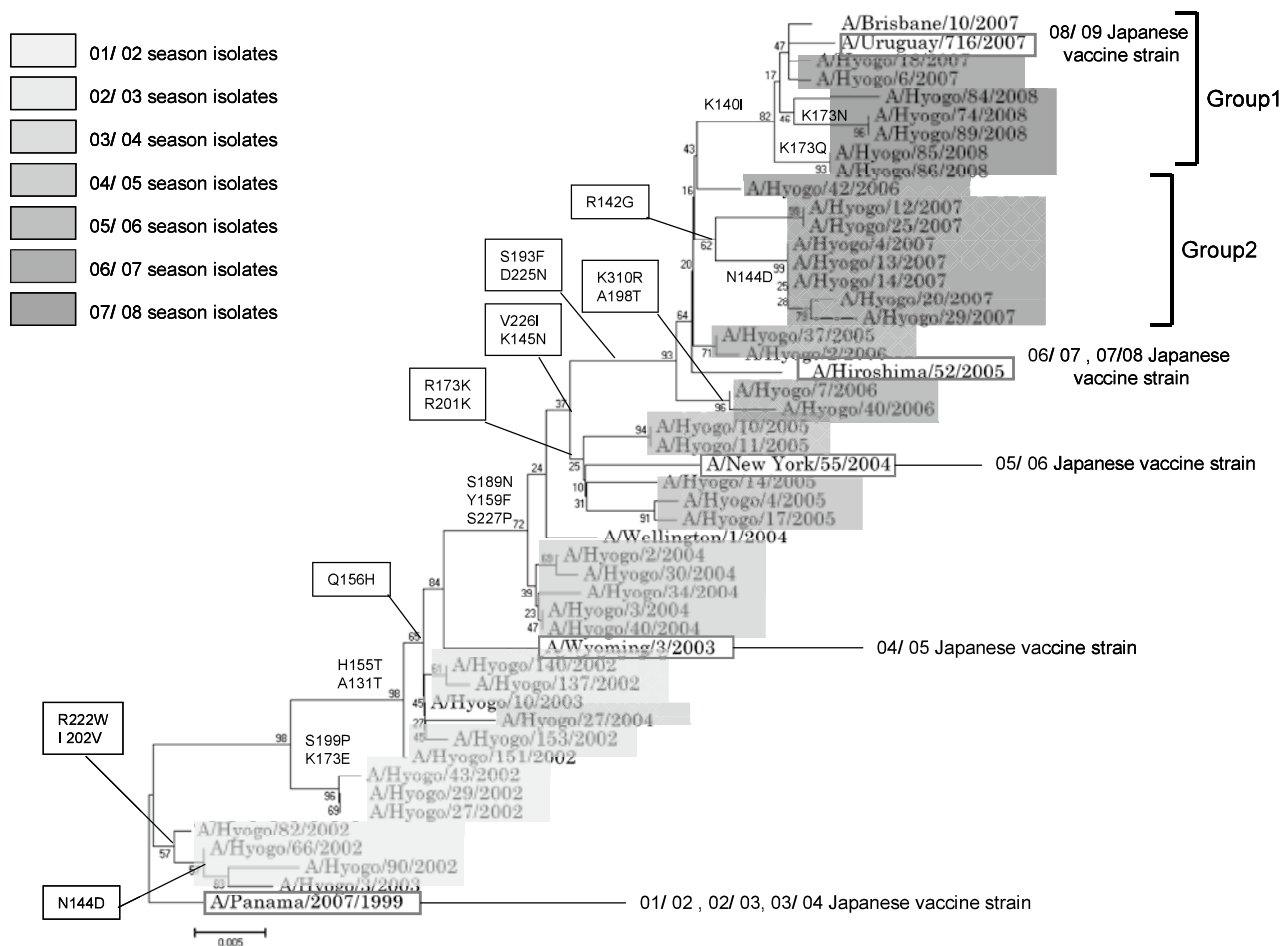


Fig.3 Phylogenetic analysis of influenza AH3 HA genes in Hyogo prefecture.

群 (2/10 株) (Group 1) と R142G の置換を持つ群 (7/10 株) (Group 2) 及び両方の置換を持たない 1 株 (A/Hyogo/42/2006) の 3 つに分類された. Group 2 はさらに N144D の置換を持つ群 (5/7 株) と持たない群 (2/7 株) に分類でき, この N144D 置換を持つ 5 株のうち A/Hyogo/20/2007 の 1 株は N216S の置換が認められた.

2007/08 シーズンの分離株 5 株は全て Group 1 に属し, K173N の置換を持つ群 (2/5 株) 及び K173Q を持つ群 (2/5 株) と両方の置換を持たない 1 株の 3 つに分類され, A/Hiroshima/52/2005 はこれとは異なる群に属していた. 2008/09 シーズンのワクチン株である A/Uruguay/716/2007 は 2007/08 シーズンの分離株と同じ Group 1 に属しており系統樹上から近縁であることが示された.

IV まとめ

2007/2008 シーズンの兵庫県におけるインフルエンザは分離した 65 株のうち 78% (51 株) を AH1 型が

占め, 流行の主体であると考えられた. しかし, 4 月になると AH1 型に代わって AH3 型が流行した. また, B 型も少数ながら流行期を通して分離された.

AH1 型流行株は分離した 51 株の 84% がワクチン株に対するフェレット感染血清に対して 8 倍以上の抗原変異を示した. また, HA 遺伝子の系統解析では異なる 2 群のウイルスの混在が確認され, いずれもワクチン株である A/Solomon Islands/3/2006 とは異なっていた.

AH3 型流行株は分離した 9 株すべてがワクチン株である A/Hiroshima/52/2005 の類似株であったが, 遺伝子レベルではすべての分離株はワクチン株とは異なる群に属していた.

文献

- 1) 根路銘国昭, 杉浦昭, 植田昌宏: オルソミクソウイルス. ウイルス実験学各論, 改訂二版, 国立予防衛生研究所学友会編, p. 287 ~ 330 (1982), (東京)
- 2) 根路銘国昭: インフルエンザウイルス, 微生物検

査必携, ウイルス・クラミジア・リケッチア検査,
第Ⅱ分冊, 各論 1, 厚生省監修, 第 3 版, 2-24, 日
本公衆衛生協会, (2004) , (東京)

3) IDWR 感染症発生動向調査週報, 国立感染症研
究所, 10, 第 17 号, 14-15(2008)

4) IASR 病原微生物検出情報(月報), 27, 第 11 号,
11-12, (2007)