

インフルエンザウイルス検出状況と薬剤耐性調査について (2016/2017 シーズン)

鈴木典子 富岡恭子 貫洞里美 峯岸俊貴 小川泰卓 中川佳子 内田和江 篠原美千代

Detection and drug resistance of influenza virus
(2016/2017 season)

Noriko Suzuki, Kyoko Tomioka, Satomi Kando, Toshitaka Minegishi,
Yasutaka Ogawa, Keiko Nakagawa, Kazue Uchida, Michiyo Shinohara

はじめに

現在、わが国において抗インフルエンザ薬はインフルエンザの治療には欠かせないものになっている。抗インフルエンザ薬として最も一般的に用いられているのはノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬であるオセルタミビルであり、新型インフルエンザ対策としても大量のオセルタミビルが備蓄されている。薬剤耐性株の出現については以前から懸念されていたが、2007年にはAノ連型 (A/H1N1) ウイルスのオセルタミビル耐性株が世界各地で検出され、国内でもその出現頻度が2007/2008シーズンには2.6%であったものが、2008/2009シーズンには99.6%となり¹⁾、わずか半年余りで劇的に増加した。わが国は世界一のオセルタミビル使用国であり、流行ウイルスが薬剤耐性を獲得しているか否かは、大きな関心事となっている。

今回は、「抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス」実施要綱に基づき実施しているH275Y変異を対象とした「A (H1N1) 2009ウイルス (AH1pdm) の抗インフルエンザ薬耐性サーベイランス」に加え、AH3型、B型の薬剤耐性調査を実施したので、この調査の基礎となるインフルエンザウイルス (IFV) の流行状況に加え系統樹解析の結果を合わせて報告する。

対象

1 インフルエンザ患者発生動向調査

埼玉県感染症発生動向調査事業として2016年9月から2017年5月まで (2016/2017シーズン) に、収集されたインフルエンザ患者報告数を使用した。

2 インフルエンザ検体からのIFV検出と型別

2016/2017シーズンに、県域 (埼玉県からさいたま市を除いた地域) において感染症発生動向調査としてインフルエンザと診断された患者から採取された614検体を調査対象とした。

3 薬剤耐性調査

2016/2017シーズンに感染症発生動向調査として採取された検体をMDCK細胞に接種し、分離されたIFV株から171株

(AH1pdm8株, AH3型70株, B型ビクトリア系統 (Bvic) 45株, B型山形系統 (Byam) 48株) を調査の対象とした。

4 系統樹解析

2016/2017シーズンに感染症発生動向調査として採取された検体をMDCK細胞に接種し、分離されたIFV株のうち、各亜型・系統別に各月5株以下を選定し、85株 (AH3型39株, Bvic20株, Byam26株) を調査の対象とした (表1)。

表1 亜型・系統別系統樹解析株数

	AH3	Bvic	Byam
9月	2	0	0
10月	4	0	0
11月	5	0	0
12月	5	1	5
1月	5	3	1
2月	5	5	5
3月	5	3	5
4月	5	5	5
5月	3	3	5
計	39	20	26

方法

1 IFVの検出と型別

検体からRNAを抽出し、AH1pdm, AH3型, B型についてはインフルエンザ診断マニュアル²⁾に準じて、リアルタイム RT-PCR法で遺伝子を検出した。

2 薬剤耐性調査

AH1pdmは、分離株を用いてインフルエンザ診断マニュアル²⁾に準じて、リアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe) 法によりH275Yの変異を調査した。

AH3型及びB型はMDCK培養上清から抽出したRNAを使用し、インフルエンザ診断マニュアル²⁾に準じてNAタンパク質をコードする領域 (NA遺伝子) を増幅後、同マニュアル及び既報^{3), 4)}のプライマーを用いダイレクトシーケン法により塩基配列を決定した。

得られた塩基配列から、GENETYX Ver. 10 (ゼネティックス) を用いてアミノ酸配列を決定後、NA阻害薬に対して耐性に関与する可能性があると報告⁵⁾のあった変異部位について、変異の有無を調査した。

3 系統樹解析

MDCK培養上清から抽出したRNAを使用し、インフルエンザ診断マニュアル²⁾に準じてHAタンパク質をコードする領域(HA遺伝子)を増幅後、同マニュアルのプライマーを用いダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

得られた塩基配列とGISAID(Global Initiative on Sharing All Influenza Data)⁶⁾に登録されている全国、世界各国で解析された株を含めて、NJ法による系統樹解析を実施した。

結果及び考察

1 定点当たり患者報告数及びIFV検出状況

図1に埼玉県における定点当たり患者報告数及び県域におけるIFV検出状況を、表2に亜型・系統別IFV検出数と検出割合を示した。

埼玉県の2016/2017シーズンの定点当たり患者報告数は2016年第45週に1を超えて流行期に入り、2017年第4週に51.68に達してピークとなった。第5週以降は報告数が減少し、20週には0.76となり流行が終息した(図1)。

IFVの型・亜型別検出状況は、AH1pdmが8検体(1.4%)から、AH3型が377検体(64.9%)から、B型が194検体(33.4%)から、型別できなかったA型(A)が2検体(0.3%)から検出された。B型はBvicが104検体から、Byamが90検体から検出され、Bvicの方がやや多く検出された。また、AH3型とByamの重複検出が1症例あり、医療機関で実施した迅速キットでA型及びB型が検出された症例であった。2016/2017シーズンの流行の主体はAH3型であり、AH1pdmの検出は少なかった。また、B型は2016年第49週から検出され始めシーズンの後半に検出数が増加し、2017年第11週以降はAH3型よりも多く検出され(図1)、全国でも同様の傾向であった⁵⁾。

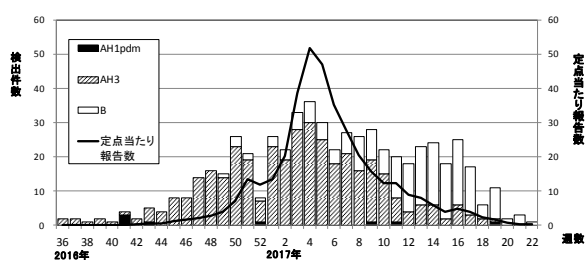


図1 埼玉県における定点当たり患者報告数及び県域におけるIFV検出状況

表2 亜型・系統別IFV検出数と検出割合

	検出数	検出割合
AH1pdm	8	1.4%
AH3	377	64.9%
Bvic	104	17.9%
Byam	90	15.5%
A	2	0.3%

2 薬剤耐性調査

型・亜型別NA阻害薬耐性変異検査結果を表3に示した。

(1) AH1pdmのH275Y変異の検出

8株を解析し、H275Y耐性変異は検出されなかった。全国では、192株が解析され、3株(1.6%)からH275Y変異が検出された⁷⁾。

(2) AH3型

10か所のアミノ酸変異を調査した。70株を解析し、変異は認められなかった。全国では、351株が解析され、耐性株は検出されなかった⁷⁾。

(3) B型

20か所のアミノ酸変異を調査した。93株を解析し、B型山形系統の1株にK360E変異が認められた。国立感染症研究所で薬剤感受性試験を実施した結果、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビルのすべての薬剤に対して、感受性を保持しており、耐性株でないことが確認された。全国では、295株が解析され、耐性株は検出されなかった⁷⁾。

表3 NA阻害薬耐性変異検査結果

	検査数	耐性変異株数
AH1pdm	8	0
AH3	70	0
Bvic	45	0
Byam	48	1

3 系統樹解析

HA遺伝子の系統樹解析の結果を図2(AH3)、図3(Bvic)及び図4(Byam)に示した。

(1) AH3型

39株はすべて2016/2017シーズンのワクチン株A/Hong Kong/4801/14株と同じクレード3C内のサブクレード3C.2aに属した。3C.2a内には、特定のアミノ酸変異を持った群が複数存在しているが、各月の株は様々な群から検出された。その中でも、2017年4月に検出された5株中2株と5月に検出された3株中3株は、2016/2017シーズンのお大半が属するサブクレード3C.2a1とは異なる群(図2①)に属していた。

(2) Bvic

20株はすべて2016/2017シーズンのワクチン株B/Texas/2/13株と同じクレード1Aに属した。12月の1株、1月の2株、2月の1株、3月の1株から同一の配列が検出されたが、他の株では検出月によるまとまりは見られなかった。

(3) Byam

26株はすべて2016/2017シーズンのワクチン株B/Phuket/3073/13と同じクレード3に属した。12月の5株中4株から同一の配列が検出されたが、他の株では検出月によるまとまりは見られなかった。一方、クレード1及びクレード2に属する株はなかった。

今回の調査では、薬剤耐性株は検出されなかった。また、系統樹解析からは、ワクチン株と異なるクレードに属する株は検出されなかった。しかし、今後も薬剤耐性株やワクチン株と異なるクレードに属する株が検出される可能性はあることから、継続的な調査を実施していくことが必要であると考えられる。

文献

- 1) 国立感染症研究所：2008/09インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況[第2報]. 病原微生物検出情報, 30, 101-106, 2009
- 2) 国立感染症研究所及び地方衛生研究所全国協議会病原体検出マニュアル インフルエンザ診断マニュアル (第3版) 平成26年9月
- 3) K. E. WRIGHT, G. A. R. WILSON, D. NOVOSAD et al. : Typing and subtyping of influenza virus in clinical samples by PCR. J. Clin. Microbiol. 33(5), 1180-1184, 1995
- 4) X. Sherry Chi, Aizhong Hu, Trentice V. Bolar, et al. : Detection and Characterization of New Influenza B Virus Variants in 2002. J. Clin. Microbiol. 43(5), 2345-2349, 2005
- 5) Summary of neuraminidase amino acid substitutions associated with reduced inhibition by neuraminidase inhibitors (NAI), http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/nai_overview/en/
- 6) GISAID, <http://platform.gisaid.org/epi3/frontend>
- 7) 国立感染症研究所:抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス. 病原微生物検出情報, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-inf.html> (2017年7月24日現在)

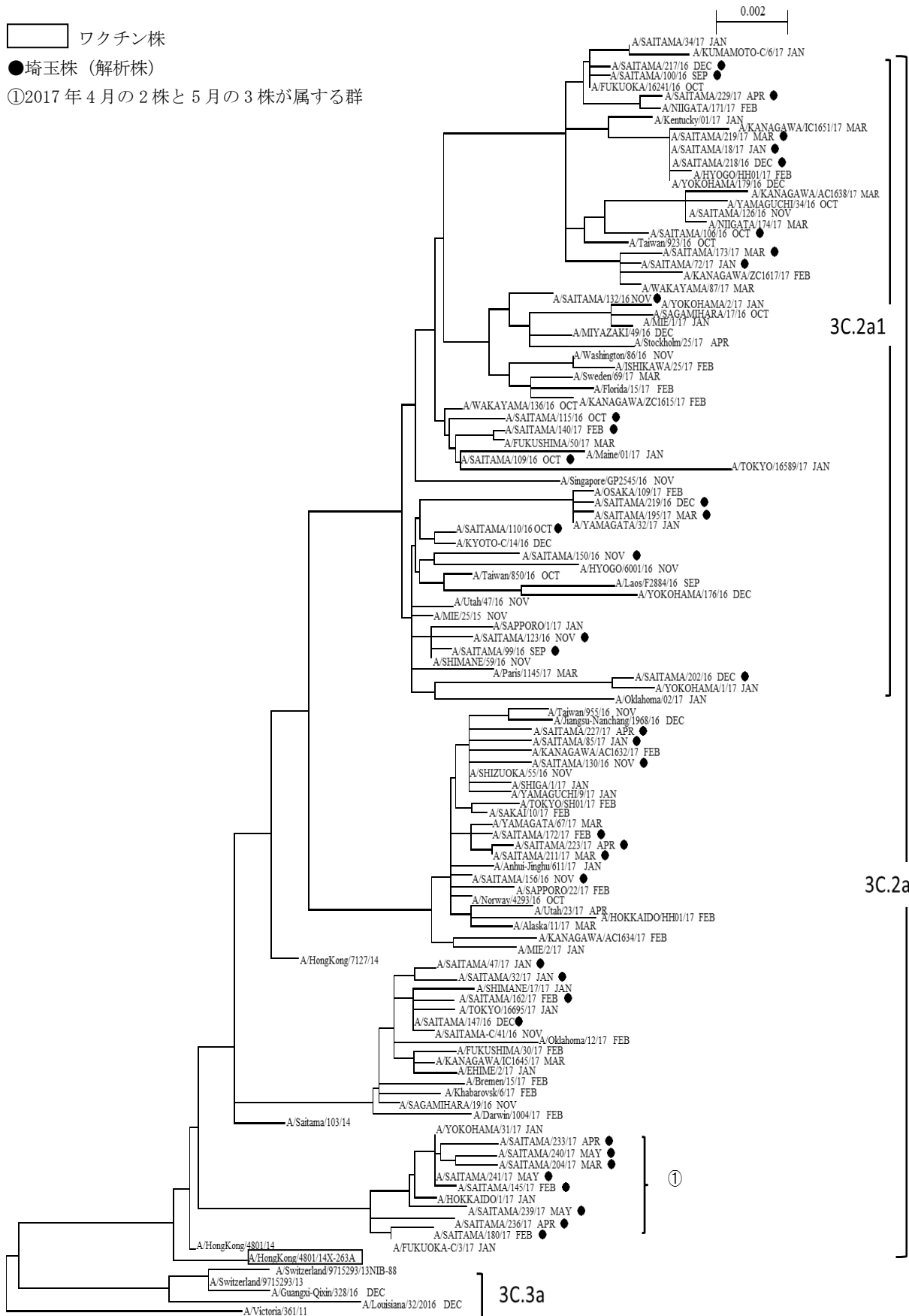


図2 HA 遺伝子系統樹(AH3 型)

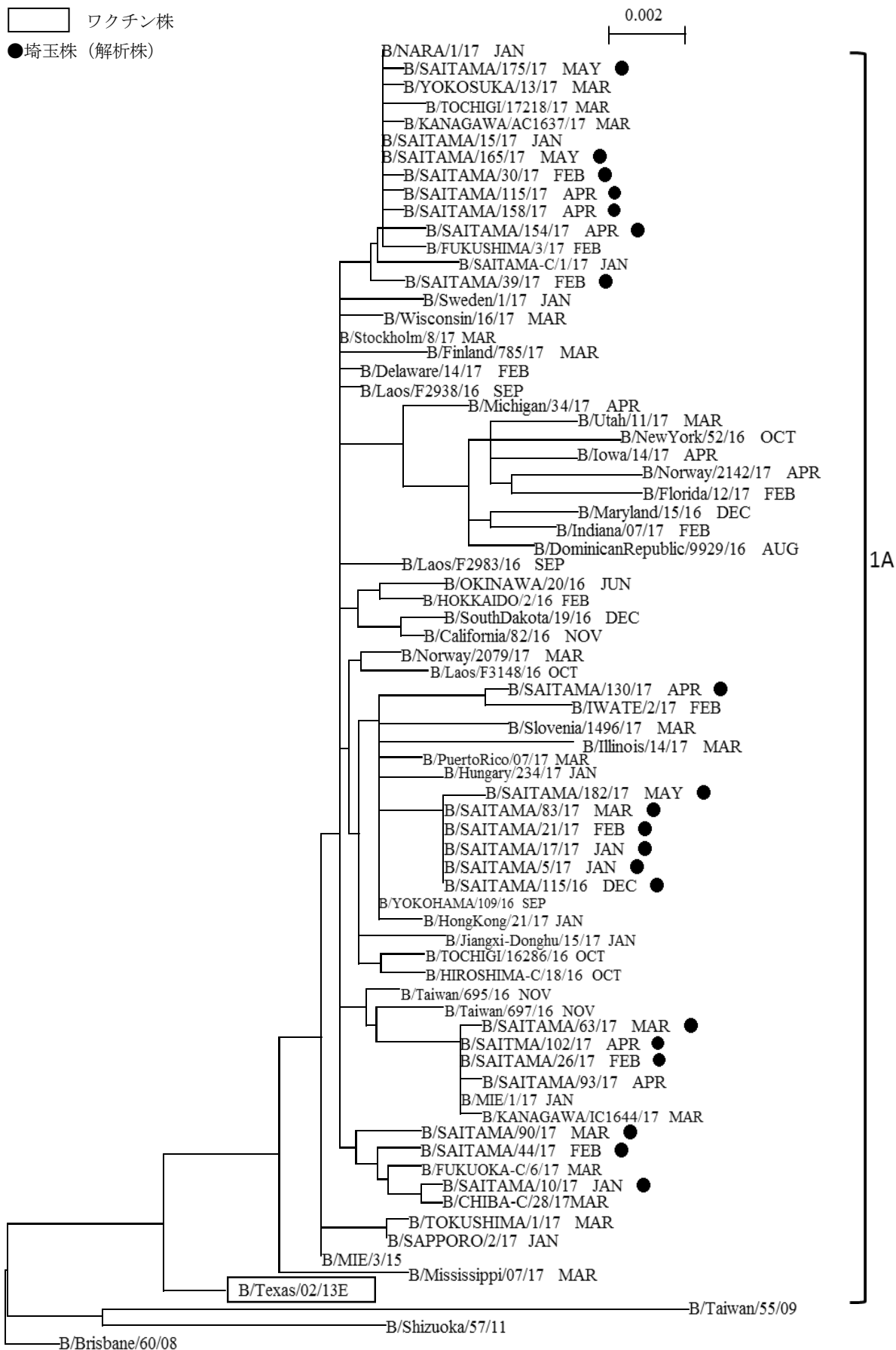


図3 HA 遺伝子系統樹解析(Bvic)

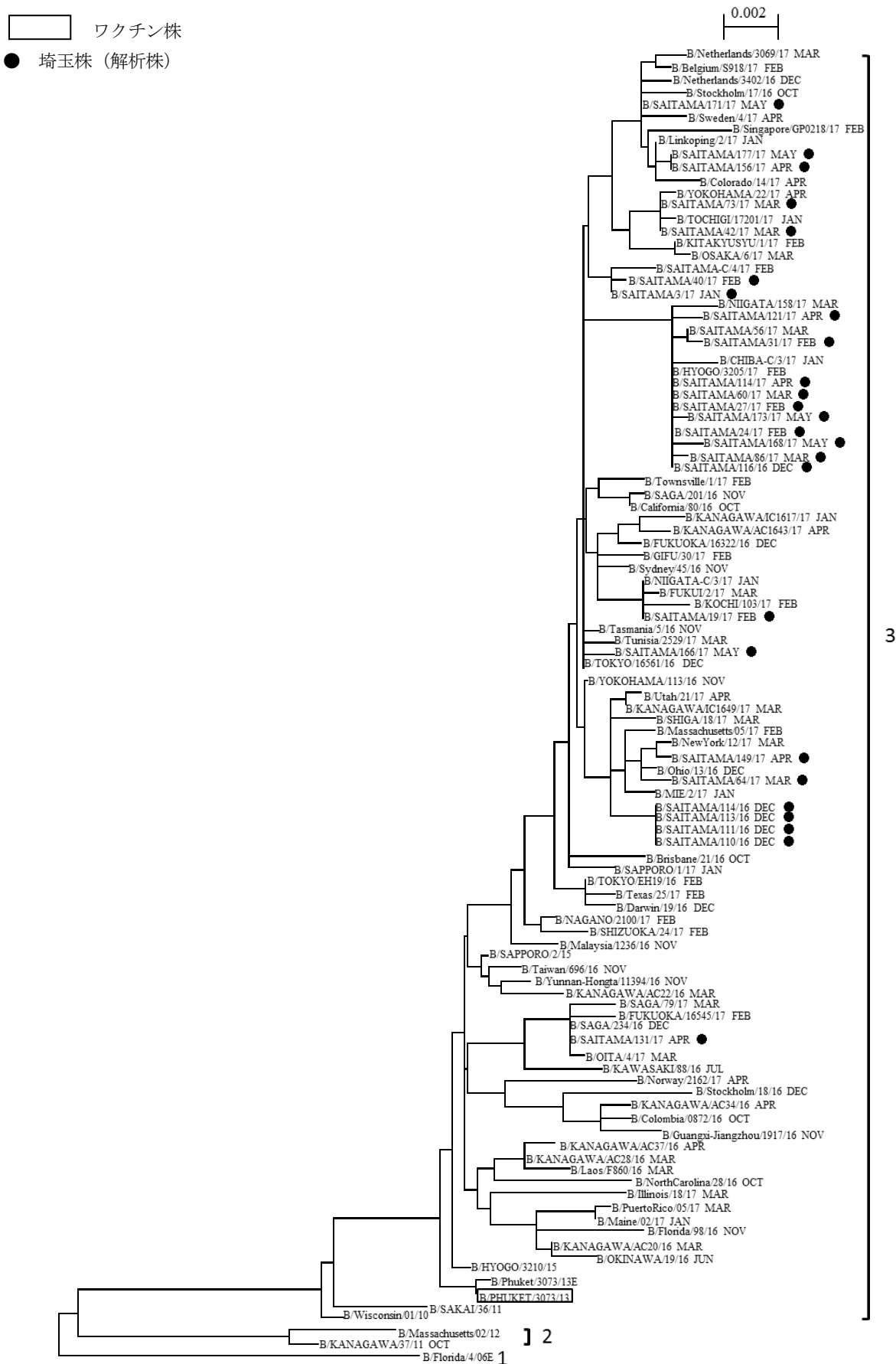


図4 HA 遺伝子系統樹解析(Byam)