

宮崎県衛生環境研究所における新型インフルエンザ検査状況

北野 智一・三浦 美穂・山本 正悟

The Summary of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Virus Inspection in the Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment

Tomokazu KITANO, Miho MIURA, Seigo YAMAMOTO

Abstract

Since WHO have decided to raise the current level of influenza pandemic alert from phase 3 to phase 4 on April 28, 2009, we have been inspecting pandemic influenza A/H1N1 2009[A(H1N1)pdm] and seasonal influenza virus. Seven hundred fifty-four patients/894 samples were inspected influenza virus by real-time RT-PCR assay and isolation using cell line in our Laboratory from April 2009 to March 2010.

We compared real-time RT-PCR and rapid-diagnosis influenza virus kits for the diagnosis influenza virus A. As the result of the comparison, 20 real-time A(H1N1)pdm RT-PCR positive samples were negative by rapid-diagnosis influenza virus kits.

Oseltamivir Resistance has been monitored by detection of tyrosine to histidine substitution at amino acid position 275 (H275Y) in neuraminidase gene. We detected H275Y mutation in 1/66 (1.5%) of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus isolated from patient who lives in Miyazaki and was not traveling by neuraminidase region sequencing.

Phylogenetic analysis performed on sequences of HA gene using neighbour-joining method. There's a tendency for isolates recently in Japan to have the S203T mutation, and most isolates in Miyazaki also had same mutation .

Key words : pandemic influenza, real-time RT-PCR, influenza kit, phylogenetic analysis

はじめに

2009年4月28日、WHOは、メキシコや米国等において発生していた豚インフルエンザ(H1N1)の感染が人から人へ継続的に認められるとして、警報レベルをフェーズ4に引き上げた。同日、これを受けた日本政府は、本疾患を感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に規定する新型インフルエンザ等感染症として位置づけた。

これに伴い、当所では、迅速に県健康増進課と行動計画等の確認を行うとともに、国立感染症研究所から配布された検査マニュアルおよび試薬の予備試験を経て、5月3日には検査体制を整えた。

国内においては、5月16日に初の新型インフルエンザ患者が確認され、本県においても6月17日に初の患者が確認された。その後、県内の患者は急速に増加し、当所への新型インフルエンザの検査依頼も増加したが、新型インフルエンザ検査への対応は、国および県が感染の拡大状況や患者の重症度等を考慮し、全数把握から段階的にサーベイランス体制を変化させたため、発生のピークとなった11月においても特に混乱することはなかった。

一方、インフルエンザ迅速キットA型陽性患者の全数把握を行っていた発生当初から、医療機関で実施されたインフルエンザ迅速診断キットと当所で行ったリアルタイムPCR検査の結果が一致

しない事例がみられ、臨床現場の医師などから問い合わせを受けることが多かった。

また、当所においては、患者検体からのウイルス分離も行い、9月上旬から開始されたオセルタミビル感受性サーベイランス検査やウイルス性状を詳細に知るための各種検査に供した。

今回、当所の新型インフルエンザの検査状況として、①新型インフルエンザ検査件数・検出数の推移、②迅速診断キットとリアルタイム PCR の結果の比較、③オセルタミビル耐性株検出状況について報告し、加えて④旅行歴のある患者由来株と県内流行株の比較を系統樹解析により行ったので報告する。

ここでは、新型インフルエンザウイルスを A(H1N1)pdm として記載した。

材料と方法

1 新型インフルエンザ検査件数および検出状況

2009年5月から2010年3月に当所で検査したインフルエンザ検査件数（臨床診断名がインフルエンザでないものも含む）および検出状況の推移を月別に集計した。

2 診断キットとリアルタイム PCR の比較

2009年5月から2010年3月にかけて、A(H1N1)pdm および季節性インフルエンザウイルス[A(H1N1), A(H3N2)]の検査を国立感染症研究所の定めたマニュアル「病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ（2009年5月 ver.1 および 2009年11月 ver.2）」に準じたリアルタイム PCR で実施し、その結果と患者調査票に記載されていた迅速診断キットの結果を比較した。なお、A型・B型両方を検査できる迅速診断キットを用いているにも関わらず、A型についての反応しか記載されていないものについては、B型を陰性として集計した。結果のみが記入され、キット名の不明な例も比較対象とした。

3 オセルタミビル感受性サーベイランス検査

当所で2009年9月上旬から12月下旬にかけて分離された株のうち、オセルタミビルおよびザナミビルの投薬状況を指標に、66株を選出し、国立感染症研究所の定めた「新型インフルエンザ A/H

1N1pdm-NA 遺伝子解析実験プロトコール」に準じ、NA 遺伝子の耐性マーカー（H275Y）の同定を行った。また、耐性マーカーの検出されたものについては、分離株を国立感染症研究所に送付し、オセルタミビルおよびザナミビル感受性試験を依頼した。

4 系統樹解析

県内で発生した新型インフルエンザ患者のうち、県外・国外への旅行歴のあった患者から分離された11株と、旅行歴のない集団発生事例および入院事例（死亡例含む）患者から分離された10株を選出し、HA 遺伝子の一部(660bp)について、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

他の国内分離株の塩基配列は The Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAI D) から参照し、MEGA 4.0 を用い、neighbor-joining method (NJ 法) にて系統樹解析を行った。

結果および考察

1 新型インフルエンザ検査件数および検出状況

新型インフルエンザの検査を実施した、患者数（検査患者数）と検体数（検査検体数）について Fig. 1 に、検査患者数におけるインフルエンザの検出状況を Fig. 2 に示した。今年度の検査患者数、検査検体数はそれぞれ754名、891検体であった。

検査患者数は、県全域にインフルエンザ警報の発令された11月が182名とピークであった。7月、9月、12月は前の月に比べ検査数が減少しているが、いずれも7月13日の全数把握の廃止、8月25日のクラスター検査の廃止、12月21日の入院事例のうち重症例・死亡例についてのみ検査を実施するといった PCR 検査に対するサーベイランス体制変更に伴うものであった。

また、全数把握を行っていた5月から7月の検査検体数は、新型インフルエンザ患者の見逃しを防ぐために、1患者について咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液あるいは鼻汁の2検体を採取していたため検査患者数に対して約2倍になっていた。

検出状況をみると、季節性インフルエンザのうちA香港型(A(H3N2))は、5月、6月に数件検出されているが、7月、8月は1件ずつしか検出されなかった。また、3月にも1件検出されたが、

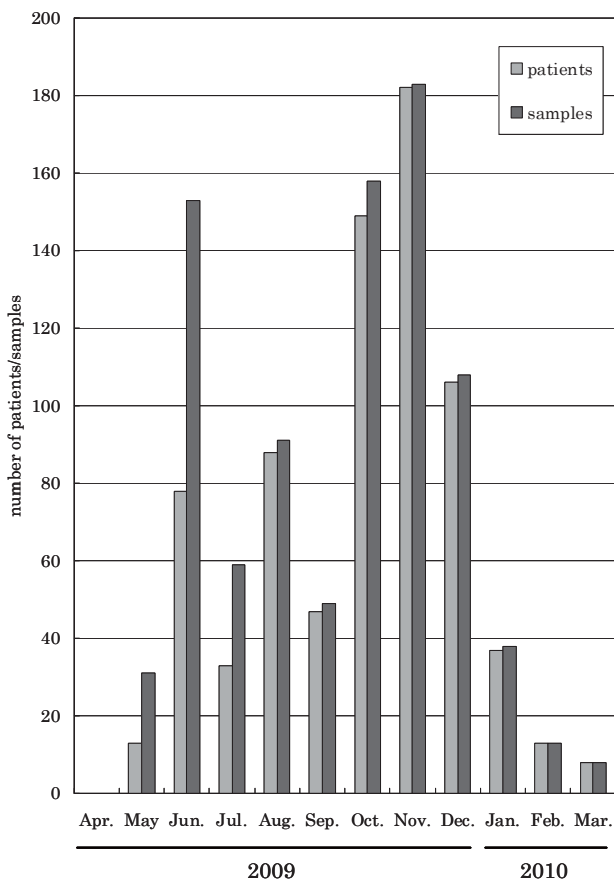


Fig. 1. Monthly changes of the number of patients and samples that tested for influenza virus.

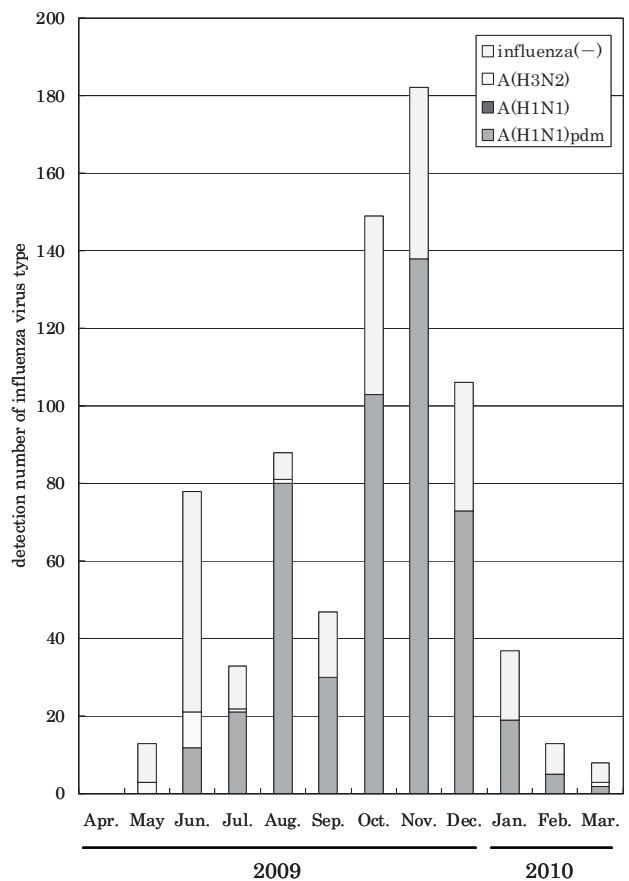


Fig. 2. Monthly changes of detection number of influenza virus type in number of patients.

患者は海外からの帰国直後で、国内での感染の可能性は低いと思われた。Aソ連型(A(H1N1))は、今年度検出されなかった。A(H1N1)pdmは、6月に検出されはじめ、7月以降の検出されたインフルエンザに占める割合はほぼ100%であり、新型インフルエンザのみが流行していたと考えられた。

2 迅速診断キットとリアルタイムPCRの比較

リアルタイムPCRと迅速診断キットの結果を比較したものをTable 1.に示した。

県内医療機関において使用された迅速診断キットは様々であった。患者調査票にキットの反応が記載されていたものは529件で、そのうち268件で13種類のキット名が明記されており、すべてA型・B型の両方を鑑別できるものであった。

リアルタイムPCRでA(H1N1)pdm陽性であった354検体中、キットが正常にA(+)B(-)を示したものは329検体(93%)であったが、20検体(5.6%)はA(-)B(-)を示していた。また、季節性インフルエンザAH3については、リアルタイムPCR

とキットの結果はよく一致していた。リアルタイムPCRが陰性であった160検体中、キットがA(-)B(-)と正しく反応したものは、79検体(49.4%)に留まった。

新型・季節性を含め、PCR陽性検体においてキットがA(+)B(-)を示したものを真陽性、PCR陰性検体においてキットがA(-)B(-)のものを真陰性としてインフルエンザA型検出における感度、特異度、一致率、偽陽性率、偽陰性率を算出した。

使用総数が30検体以上であったキット①から⑤に注目すると、感度はキット④が83%と最も低いものの、その他のキットは90%以上の高い感度を示した。それに対し、特異度はキット⑤が89%と高いものの、その他のキットは50%以下と低く、キット③の17%が最低となった。

キット全体では、感度93%、特異度49%、一致率80%、偽陽性率51%、偽陰性率7%となった。全体的に、偽陽性率が高く、偽陰性が低かったことやキットA(-)B(-)の患者についても当所での詳細検査を依頼する例が多く、インフルエンザ感

Table 1. Comparison of real-time RT-PCR and rapid-diagnosis influenza virus kits for the detection influenza virus A

a kind of influenza virus kit	the result of rapid-diagnosis influenza virus kits to real-time RT-PCR										sensitivity	specificity	concordance rate	false negative	false positive	
	A(H1N1)pdm positive (n=354)					A(H3N2) positive (n=15)										Influenza negative (n=160)
	A+B-	A+B+	A-B-	A-B+	A+B+	A+B-	A+B-	A+B+	A-B-	A-B+						
Kit ①	47	1	1	1	9	1	1	5	96%	33%	81%	4%	67%			
Kit ②	21	2	1	1	3	9	1	13	92%	50%	70%	8%	50%			
Kit ③	25	2	1	4	10	4	4	2	91%	17%	70%	9%	83%			
Kit ④	13	3	2	2	4	4	4	4	83%	33%	63%	17%	67%			
Kit ⑤	20	1	1	1	1	1	8	100%	89%	97%	0%	0%	11%			
Kit ⑥	11	1	1	1	1	1	1	100%	100%	100%	0%	0%	0%			
Kit ⑦	6	1	1	1	1	1	2	100%	50%	80%	0%	0%	50%			
Kit ⑧	10	10	100%	##	100%	##	100%	##	100%	0%	0%	0%	##			
Kit ⑨	3	2	100%	0%	67%	0%	100%	0%	100%	0%	67%	0%	100%			
Kit ⑩	11	10	100%	0%	91%	0%	1	100%	100%	0%	91%	0%	100%			
Kit ⑪	1	1	100%	##	100%	##	100%	##	100%	0%	100%	0%	##			
Kit ⑫	2	1	100%	100%	100%	100%	1	100%	100%	100%	100%	0%	0%			
Kit ⑬	1	1	##	0%	0%	##	1	##	0%	0%	0%	##	100%			
unknown	261	162	1	1	13	7	27	7	43	92%	81%	8%	44%			
total	529	329	4	1	20	15	0	0	23	2	79	93%	49%	80%	7%	51%

All ratios calculated influenza type A detection. ## : not possible to calculate. "A(-+)B(-+)" shows the result of influenza virus kit.

染患者がキットの結果で見逃されることは少なかったと考えられる。しかし、臨床現場において新型インフルエンザ感染患者がキット陰性となる事例がみられたことから、迅速診断キットの結果のみでは、感染患者を見逃す可能性があることが示唆された。

3 オセルタミビル耐性株検出状況

オセルタミビル耐性マーカーの検査状況を Table 2. に示した。2009年9月上旬から12月下旬の流行期に分離された株のうち、オセルタミビルおよびザナミビルの投薬状況を指標に選出した66株についてオセルタミビル耐性マーカーの検査を行ったところ、1株(A/MIYAZAKI/111/2009pdm)のNA遺伝子からH275Y耐性マーカーが検出された。この株が分離された患者は、インフルエンザ疑いで入院し、タミフルの治療投与を受けていた。

また、国立感染症研究所で検査された耐性マーカー保有株の薬剤感受性試験の結果を Table 3. に示した。A/MIYAZAKI/111/2009pdmは、オセルタミビル感受性株であるA/DENMARK/524/2009pdmに対し約480倍感受性の低下がみられたものの、ザナミビルへの感受性は保持していた。

全国においても同様に検査が実施され、12月上旬時点でのオセルタミビル耐性株の出現頻度は1.6%となっている¹⁾。宮崎県の出現頻度は1.5%(1/66)で、全国と同等であり、オセルタミビル耐性株が県内において流行している可能性は低いと考えられた。

4 系統樹解析

県内患者と国内患者から分離された新型A(H1N1)pdmウイルスのHA遺伝子について、系統樹解析を行った結果を Fig. 3. に、また、選出した県内分離株について、患者の旅行歴と検出されたアミノ酸置換を Table 4. に示した。

県内で分離された株は、旅行歴、採取時期に関わりなく全国の分離株と同様に、A/Narita/1/2009とA/California/07/2009[X179A](日本の新型ワクチン株)を含む1つのクラスターに属していた(Fig. 3.)。

県内分離株は、A/Narita/1/2009に対して1から4個のアミノ酸が置換していた(Table 4.)。

最近の国内株はアミノ酸配列のS203T置換を共通に持つサブクラスターを形成する傾向にあると報告されているが²⁾、選出した株で最も採取時期が早い“Miyazaki 095”以外のすべての株はS203T置換を保有していた。また、10月以降に分離された株の半数は、A197T置換を保有していた。

最も多くのアミノ酸置換を保有していたのは採取時期が12月と最も遅い“Miyazaki 694”であった。“Miyazaki 694”は、県内で感染した患者から分離されており、県内において、それまでの株とは大きく異なったアミノ酸置換部位を持つ株が出現し始めたと考えられた。また、この株は死亡患者由来であった。今後、この株と2010年1月以降の分離株についても解析を行い、県内の流行株と類似するのかが、保有したアミノ酸置換が、死亡例特有のものであるのか明らかにしたい。

参考文献

- 1) <速報>新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)オセルタミビル耐性株(H275Y)の国内発生状況 [第1報]. 病原微生物検出情報, Vol. 31 No.2, 49-53, (2010)
- 2) <特集関連情報>2008/2009シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析. 病原微生物検出情報, Vol.30 No.1, 3-13, (2009)

Table 2. Detection of Oseltamivir-resistance marker from influenza A(H1N1)pdm viruses in Miyazaki during September–December 2009

total number of samples	kind of Case				antiviral treatment				Oseltamivir-resistance marker	
	sporadic infection	Group infection	Family infection	Hospitalization	Before dosing	Oseltamivir	Zanamivir	unknown	H275Y	H275
66	7	12	3	44	26	34	4	2	1	65

Table 3. Oseltamivir and Zanamivir sensitivity test

Strains	Subtype	H275Y	IC50(nM) [#]	
			Oseltamivir	Zanamivir
A/CALIFORNIA/07/2009Epdm*	H1N1pdm	275H	0.10	0.40
A/NARITA/1/2009Epdm*	H1N1pdm	275H	0.37	0.99
A/MIYAZAKI/111/2009pdm	H1N1pdm	275Y	48.54	0.25
A/DENMARK/528/2009pdm (Oseltamivir-resistance cotrol)	H1N1pdm	275Y	39.63	-
A/DENMARK/524/2009pdm (Oseltamivir-sensitive control)	H1N1pdm	275H	0.09	-
Average IC 50 of Oseltamivir-sensitive influenza A/H1N1 strains			0.09±0.01	0.28±0.05

A/MIYAZAKI/111/2009pdm strain was tested Oseltamivir and Zanamivir sensitivity in the National Institute of Infectious Diseases on January 21, 2009.

*previous data, [#] half maximal (50%) inhibitory concentration

Table 4. Pandemic influenza virus strains for phylogenetic analysis and detected pattern of amino acid mutation

Strain Information				Pattern of amino acid mutation		
Strains Lab.No.	Date of sampling	Patient's address	History of traveling			
Miyazaki 095	06/18	Miyazaki city	Tokyo (Japan)	L32I		
Miyazaki 179	06/29	Kobayashi city	Philippines			S203T
Miyazaki 185	07/02	Kobayashi city	Canada	N87K		S203T
Miyazaki 195	07/03	Nichinan city	Osaka (Japan)			S203T
Miyazaki 216	07/09	Miyazaki city	New Zealand			S203T
Miyazaki 242	07/31	Miyazaki city	Micronesia			S203T
Miyazaki 299	08/17	Nobeoka city	Nara (Japan)			S203T
Miyazaki 313	08/19	Kiyotake town	Okinawa (Japan)			S203T
Miyazaki 315	08/18	Miyakonojo city	Fukuoka,Nagasaki (Japan)			S203T
Miyazaki 375	08/26	Nobeoka city	no traveling	A186T		S203T
Miyazaki 383	09/09	Miyazaki city	no traveling			S203T
Miyazaki 419	10/21	Miyakonojo city	Fukuoka (Japan)	K171R	A197T	S203T
Miyazaki 504	11/05	Nichinan city	no traveling		A197T	S203T
Miyazaki 505	11/05	Miyakonojo city	no traveling		A197T	S203T
Miyazaki 527	11/10	Miyakonojo city	Kagoshima (Japan)			S203T
Miyazaki 654 [※]	12/09	Miyazaki city	no traveling	K171R	A197T	S203T
Miyazaki 662	12/12	Hyuga city	no traveling			S203T
Miyazaki 684	12/18	Nobeoka city	no traveling	K171R	A197T	S203T
Miyazaki 685	12/19	Takanabe Town	no traveling			S203T
Miyazaki 686	12/19	Miyazaki city	no traveling			S203T
Miyazaki 694 [※]	12/25	Takachiho town	no traveling	T120I	V132A	S162N S203T

※: Fatal case

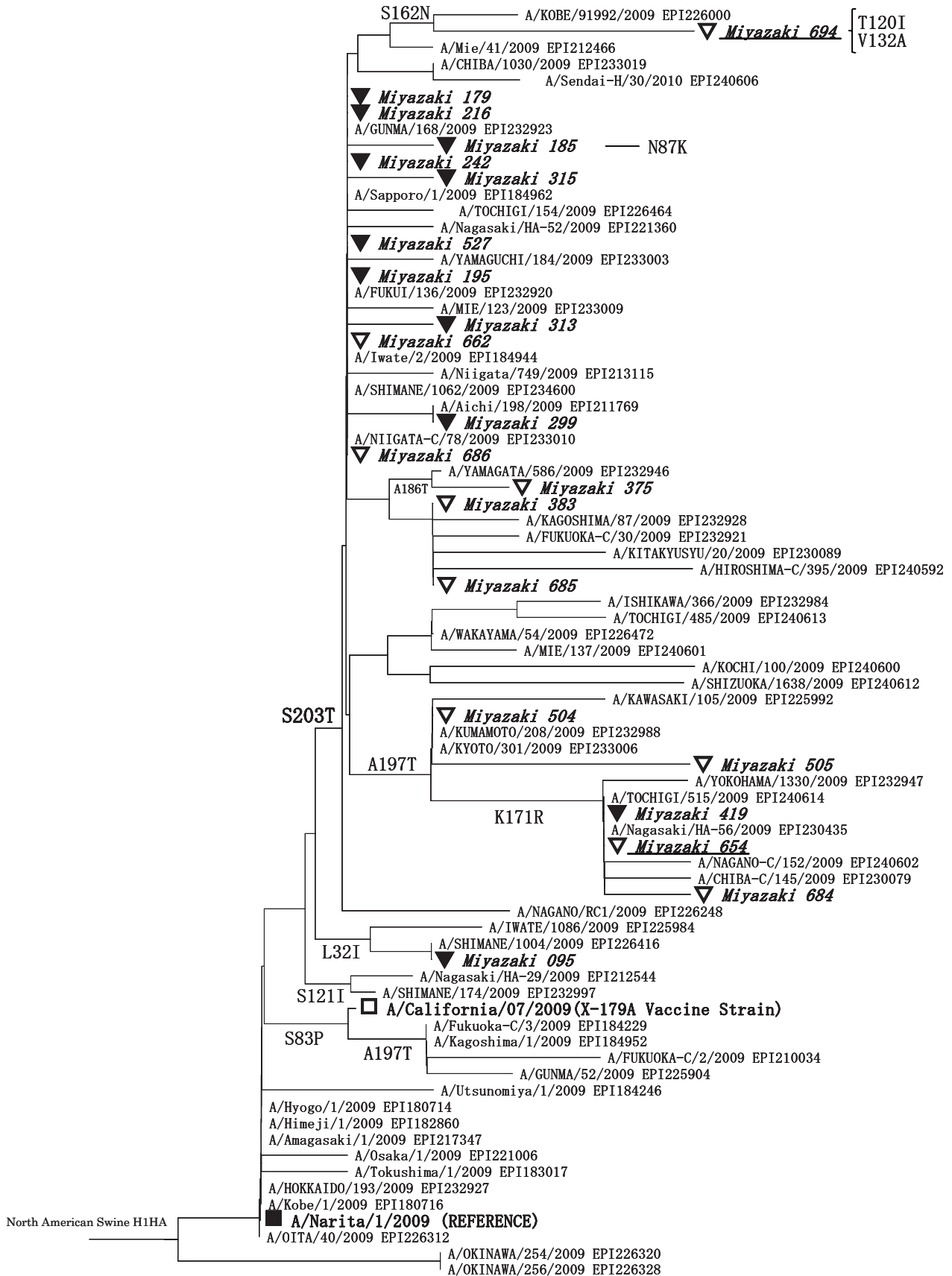


Fig. 3. Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1)pdm HA genes (660bp)

■: Isolated from the first patient in Japan, □: influenza A(H1N1)pdm vaccine strain, ▼: Isolated from patients who traveled to other countries or other prefectures, ▽: Isolated from patients who did not travel to other countries or other prefectures, “—”: under line shows fatal case.