

## 便および髄液検体からのインフルエンザウイルス AH1pdm の分離および抗原検出

名古屋市衛生研究所微生物部

後 藤 則 子

(平成 23 年 1 月 5 日受付)

(平成 23 年 10 月 18 日受理)

Key words: influenza virus AH1pdm, viral isolation, stool, cerebrospinal fluid

### 序 文

インフルエンザウイルスの分離および抗原検出には、鼻咽頭材料を用いるのが一般的である。ところが、2009 年 11 月、名古屋市における感染症発生動向調査検査定点から、インフルエンザ脳症の疑いで便検体のみが搬入され、インフルエンザウイルス AH1pdm を分離した。以後、後方視、前方視的に便検体からウイルス分離を行った。また、季節性インフルエンザでは、神経症状を伴う患者からの分離例は少ない<sup>1)</sup>が、髄液検体からもインフルエンザウイルス AH1pdm を分離したので、報告する。

### 材料および方法

季節性インフルエンザの流行期において、感染症発生動向調査検査定点から搬入された鼻咽頭検体および髄液検体については、通年、インフルエンザウイルスの分離を試みてきた。

2009 年 5 月から 2010 年 3 月にかけて、名古屋市の感染症発生動向調査検査定点および入院サーベイランスから搬入された便 14 検体および髄液 19 検体について、インフルエンザウイルス AH1pdm の分離を行った。一部の検体については、Real-time RT-PCR を実施した。便 14 検体のうち、10 検体は -80℃ での保存検体から、検体送付時の臨床診断名により、インフルエンザの感染が疑われる検体を抜粋して、後方視的にを行った。4 検体は前方視的にを行った。髄液検体は、搬入時にウイルス分離を行った。

ウイルス分離は 24 穴の組織培養用プレートを用い、MDCK 細胞の単層培養で実施した。培養上清の一部を継代し、残りは培養を継続した。継代毎に、赤血球凝集 (HA) 試験を行い、HA 価を測定した。分離ウ

イルスの同定には、国立感染症研究所インフルエンザセンターから分与された抗 A/California/07/2009 (H1N1pdm) フェレット感染免疫血清を使用して、赤血球凝集抑制 (HI) 試験を行った。また、Real-time RT-PCR は、国立感染症研究所「病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ」による TaqMan Probe 法で実施した。

インフルエンザウイルス AH1pdm のウイルス分離と Real-time RT-PCR を併用して行った 90 検体の検査成績を比較検討した。

### 結 果

便検体でのインフルエンザウイルス AH1pdm の分離陽性症例 7 例を Table 1 に示した。後方視的に行った 10 検体中の症例 3, 4 で、継代 5 代において、HA 価が認められたので、継代を続行した。継代 6 代において、症例 1, 2 でも HA 価が認められた。これらの分離株の HA 価は低く、さらに継代して増殖させて型同定を行った。なお、これらの便検体は凍結保存であったので、ウイルスが不活化している事を考慮して PCR を行ったが陰性であった。

症例 1 は、咽頭検体から、インフルエンザウイルス AH3 が分離同定されている。

便検体からの分離を行う発端となった症例 5 は、継代 4 代で HA 価が認められた。確認のために、検体から直接行った PCR も陽性であった。前方視的に行った 3 検体中、症例 6 および症例 7 の 2 検体に、継代 4 代において HA 価が認められた。当施設では、基本的に、感染症発生動向調査の検体については、PCR を行っていないので、これらの検体は PCR を行っていない。症例 6 は咽頭検体、髄液検体からも分離陽性であった。

陽性者の年齢は 0 歳から 8 歳であった。臨床診断名

別刷請求先: (〒467-8615) 名古屋市瑞穂区萩山町 1-11

名古屋市衛生研究所微生物部 後藤 則子

Table 1 Viral isolation from stool

Case	age (gender)	specimen obtained	onset	clinical diagnosis	symptoms	isolation and PCR from stool		isolation from other specimens
1	1y (female)	Jun.8, 2009	Jun.5, 2009	idiopathic eruption	fever, eruption	positive (MDCK-6)*	negative	positive: AH3 (oropharynx)
2	2y (male)	Aug.9, 2009	Aug.7, 2009	acute encephalopathy	fever, delirium, convulsions, vomiting, diarrhea	positive (MDCK-6)	negative	negative (cerebrospinal fluid)
3	9m (female)	Sep.3, 2009	Aug.31, 2009	acute encephalopathy	fever, delirium	positive (MDCK-5)	negative	negative (cerebrospinal fluid)
4	8y (male)	Nov.8, 2009	Nov.3, 2009	acute encephalopathy	fever, delirium, diarrhea, abdominal pain, sorethroat, pharynx redness	positive (MDCK-5)	negative	negative (cerebrospinal fluid)
5	4y (female)	Nov.19, 2009	Nov.15, 2009	suspected influenza-virus-induced encephalopathy	fever, delirium, nausea, vomiting, diarrhea, pharynx redness	positive (MDCK-4)	positive	negative (cerebrospinal fluid)
6	1y (female)	Jan.19, 2010	Jan.19, 2010	suspected Reye's syndrome	fever, delirium, convulsions, diarrhea	positive (MDCK-4)	not done	positive (oropharynx, cerebrospinal fluid)
7	1y (male)	Feb.2, 2010	Jan.27, 2010	infectious gastroenteritis	fever, nausea, vomiting, diarrhea, cough	positive (MDCK-4)	not done	not done

\*MDCK-history of serial passages

Table 2 Viral isolation and detection of antigen from cerebrospinal fluid

Case	age (gender)	specimen obtained	onset	clinical diagnosis	symptoms	isolation and PCR from cerebrospinal fluid		isolation and PCR from other specimens	
1	11m (female)	Aug.14, 2009	Aug.12, 2009	acute encephalopathy	fever, delirium, convulsions	positive (MDCK-4)*	not done	negative (stool)	not done
2	2m (female)	Aug.25, 2009	Aug.24, 2009	idiopathic fever	fever	positive (MDCK-2)	not done	positive (oropharynx)	not done
3	1y (male)	Oct.1, 2009	Oct.1, 2009	upper respiratory tract infection, febrile convulsion	fever, convulsions	positive (MDCK-4)	not done	positive (oropharynx)	not done
4	6y (female)	Oct.5, 2009	Oct.5, 2009	aseptic meningitis	fever, nausea, vomiting, neck stiffness	positive (MDCK-4)	not done	negative (oropharynx)	not done
5	25y (male)	Oct.26, 2009	Oct.19, 2009	influenza-virus-induced encephalopathy	fever, delirium, convulsions	positive (MDCK-2)	negative	not done	not done
6	6y (female)	Nov.2, 2009	Nov.1, 2009	suspected influenza-virus-induced encephalopathy	fever, convulsions, vomiting, cough, sorethroat, pharynx redness	positive (MDCK-4)	not done	positive (oropharynx)	not done
7	3m (female)	Nov.3, 2009	Nov.3, 2009	influenza	fever, nausea, vomiting, neck stiffness	positive (MDCK-8)	not done	not done	not done
8	3m (female)	Nov.6, 2009	Nov.6, 2009	idiopathic fever	fever, convulsions	positive (MDCK-3)	not done	positive (oropharynx)	not done
9	8y (male)	Nov.18, 2009	Nov.17, 2009	influenza-virus-induced encephalopathy	fever, delirium, convulsions, headache, cough, sorethroat, pharynx redness	negative	positive	negative (oropharynx)	positive
10	1y (female)	Jan.19, 2010	Jan.19, 2010	suspected Reye's syndrome	fever, delirium, convulsions, diarrhea	positive (MDCK-4)	not done	positive (oropharynx, stool)	not done

\*MDCK-history of serial passages

は急性脳症 3 名, インフルエンザ脳症疑い 1 名, Reye 症候群疑い 1 名, 感染性胃腸炎 1 名, 不明発疹症 1 名であった。5 名は胃腸炎症状を伴っていた。

インフルエンザ (H1N1) 2009 流行以前の過去 10 年間の季節性インフルエンザ流行期において, 感染症発生動向調査検査定点から搬入され, ウイルス分離を実施した髄液 331 検体では, 季節性インフルエンザウイルスの分離陽性例はなかった。

髄液検体でのインフルエンザウイルス AH1pdm の分離および検出陽性症例 10 例を Table 2 に示した。19 検体中 9 検体で分離陽性, 1 検体で PCR 陽性であった。このうち症例 5 は PCR を行ったが陰性であった。症例 9 は分離陰性, PCR 陽性であった。陽性症例の

HA 価が認められるまでの継代歴は 2 代から 8 代であった。症例 1 では継代歴は 4 代, 症例 7 では継代歴は 8 代であったが, HA 価は 4 倍と低く, 後者はさらに継代しても HA 価は上昇しなかった。症例 7 については, HA 試験において僅かに凝集が認められるが, HA 価が得られなかったため, 継代を続けた。

陽性者の年齢は 0 歳から 8 歳の小児 9 名, 25 歳の成人 1 名であった。臨床診断名はインフルエンザ脳症 3 名 (疑い 1 名), 不明熱 2 名, 急性脳症 1 名, インフルエンザ 1 名, Reye 症候群疑い 1 名 (便検体陽性症例と同一症例), 上気道炎および熱性痙攣 1 名, 無菌性髄膜炎 1 名であった。5 名は咽頭検体からも分離した。PCR 陽性の 1 名は咽頭検体でも PCR 陽性で

あった。

インフルエンザウイルス AH1pdm のウイルス分離と PCR を併用して行った 90 検体では、ウイルス分離と PCR とともに陽性が 74 検体、陰性が 6 検体であった。結果が不一致の 10 検体では、ウイルス分離陽性で PCR 陰性が 8 検体、ウイルス分離陰性で PCR 陽性が 2 検体であった。

### 考 察

当施設では、感染症発生動向調査のために搬入された鼻咽頭検体および髄液検体については、通年、インフルエンザウイルスの分離のため MDCK 細胞に接種して、分離を試みている。

通常、インフルエンザ様疾患の病原体診断用検体として便検体は採取されていない。しかし、2009 年 11 月にインフルエンザ脳症疑いで、4 歳患児の便検体のみが搬入されたので、ウイルス分離を行った。継代 4 代目でインフルエンザウイルス AH1pdm を分離同定した。また、コンタミネーションの可能性も考慮して、検体から直接 Real-time RT-PCR を実施したところ、陽性であった。これ以後、保存検体からインフルエンザの感染が疑われる 10 検体を抜粋して、後方視的にウイルス分離を行い、4 検体から分離した。これらの検体は PCR 陰性であった。

便検体からのインフルエンザウイルス AH1pdm の分離・検出例は香港からも報告されている<sup>2)</sup>。この報告によると、9 例中 4 例から PCR で検出され、最もウイルス量が多かった便からのみウイルスが分離されている。PCR の検出感度がウイルス分離より高いと推察される。

しかし、当施設では、分離陽性の 4 検体は PCR では陰性であり、検出感度として、ウイルス分離の方が高かった。その要因の一つに、ウイルスが分離検出されるまで数代の継代を必要としており、検体中のウイルス量が PCR では検出限界以下であったことが推察される。分離培養の継代数を重ねることがウイルス量の増加につながり、分離の確率が高くなったと考えられる。

インフルエンザ (H1N1) 2009 流行シーズン中の検査体制における、4 月 28 日～7 月 23 日の全数検査期間および 7 月 24 日～8 月 24 日の集団および入院サーベイランス検査期間は、当施設での検査方法は Real-time RT-PCR が中心で、ウイルス分離は一部の検体についてのみ行った。その後、ウイルス株サーベイランスが開始され、当市で体制の整った 9 月以降は、ウイルス分離を併用した。

この期間、インフルエンザウイルス AH1pdm のウイルス分離と PCR を併用して行った 90 検体では、10 検体でウイルス分離と PCR の結果が不一致であった。

この中で、ウイルス分離陽性で PCR 陰性が 8 検体、ウイルス分離陰性で PCR 陽性が 2 検体であった。この結果から、ウイルス分離の方が検出率は高かった。

髄液からの分離、抗原検出については、季節性インフルエンザでは、髄液検体からのウイルス分離例は少ない<sup>1)</sup>とされている。名古屋市感染症発生動向調査においても、通年、臨床診断名に関わらず、検体量の許す限り髄液検体からもインフルエンザウイルスの分離を試みてきたが、季節性インフルエンザウイルスの分離陽性例はなかった。

1996/1997 インフルエンザシーズン中に、名古屋市内の病院から、インフルエンザ様疾患に関連した急性脳症、脳炎患者の髄液検体から PCR で高頻度に検出された症例が報告され、名古屋地域での流行が示唆されている<sup>3)</sup>。しかし、当時は当施設では髄液検体からの PCR は行っていないので、把握できていない。

今回、インフルエンザ (H1N1) 2009 流行シーズン中の 2009 年 5 月から 2010 年 3 月の髄液 19 検体から 9 検体でインフルエンザウイルス AH1pdm を分離した。なお、1 検体は分離陰性であったが、PCR で検出できた。

当施設では、感染症発生動向調査のために搬入された髄液検体についても、通年、検体量の許す限りインフルエンザウイルスの分離を行っている。しかし、基本的に髄液検体は少量のため、陽性症例については一部の検体のみ PCR を行った。症例 5 は入院サーベイランスから搬入された検体であるため PCR を先行し、症例 9 はインフルエンザ脳症患者の凍結検体であるため PCR を優先して行った。これらの症例のウイルス分離と PCR の結果は不一致であった。

前述のように、当施設では、ウイルス分離の方が検出率は高かったが、検体の状態が凍結融解などによって、ウイルスが不活化している場合は、PCRの方が検出感度は高くなる場合があると考えられる。

ウイルス分離陽性症例は、継代歴が少なく比較的容易に分離できたものから数代継代して分離が可能となったものなど多岐にわたり、おそらく検体中のウイルス量が様々であったことが示唆された。

実際の手技上、PCR を含めコンタミネーションの問題が残されているが、まず後方視的に実施した便検体の分離時はこれらの検体のみの培養プレートで行っているため、コンタミネーションの可能性は否定的である。また、症例 5 以後に搬入された検体については搬入時に分離を行った。この時期、当施設では検体搬入も少なく、コンタミネーションの可能性は低い。

さらに、髄液検体からの分離時には培養プレートの端に接種し、他の検体との間にはコントロールを置き、コンタミネーション防止に努めた。また、Real-time

RT-PCR は1チューブで行うものであり、コンタミネーションの可能性は低い。

国立感染症研究所感染症情報センターへの2009年28週から2010年35週のインフルエンザ脳症の報告数は321件あり、例年の10倍にも及ぶ報告数であった。今回の便および髄液検体からの分離および検出は、このような流行状況や、精度管理にまつわる検体中のウイルス量ならびに季節性、AH1pdm とのウイルス学的な特性も含め、今後検討されるべき問題点であろう。

具体的には、便または髄液から分離された症例において、症状や身体所見にウイルスがどのように関与したかは不明であり、インフルエンザウイルス AH1pdm のヒトへの病原性や臓器親和性、宿主側の生体反応などについては、さらに症例を蓄積した上での検討が必要である。

今回、インフルエンザウイルス AH1pdm が便検体から分離されたことは、インフルエンザ感染の標準予防対策に新たな考慮が必要であることを示唆するもの

である。

非学会員共同研究者：伊藤哲哉，安藤直樹，小林悟；名古屋市立大学病院小児科，尾坂行雄，稲垣晴代；名古屋市立緑市民病院小児科，神岡直美，福田純男，林直史；西部医療センター城北病院小児科，向井榮一郎；名古屋医療センター神経内科

#### 文 献

- 1) Maricich SM, Neul JL, Lotze TE, Cazacu AC, Ueki TM, Demmler GJ, *et al.* : Neurologic complications associated with influenza A in children during the 2003-2004 influenza season in Houston, Texas. *Pediatrics* 2004 ; 114 : 626—33.
- 2) To KW, Chan K, Li IS, Tsang T, Tse H, Chan JW, *et al.* : Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. *J Med Virol* 2010 ; 82 : 1—7.
- 3) Fujimoto S, Kobayashi M, Uemura O, Iwase M, Ando S, Katoh T, *et al.* : PCR on cerebrospinal fluid to show influenza-associated acute encephalopathy or encephalitis. *The Lancet* 1998 ; 352 : 873—5.

#### Viral Isolation and Influenza Virus Antigen Detection AH1pdm from Stool and Cerebrospinal Fluid

Noriko GOTO

Microbiology Department of Nagoya City Public Health Research Institute,

[J.J.A. Inf. D. 86 : 34~37, 2012]