

[ノート]

兵庫県における 2013/14 シーズンのインフルエンザウイルスの性状解析

押部 智宏^{1*} 萩 美貴¹ 高井 伝仕¹ 近平 雅嗣¹ 岡藤 輝夫² 三村 昌司¹

Characteristic Analysis of the Epidemic Influenza Viruses in Hyogo Prefecture, Japan, during 2013/14 Season.

Tomohiro OSHIBE^{1*}, Miki OGI¹, Densi TAKAI¹, Masatsugu CHIKAHIRA¹,
Teruo OKAFUJI² and Masashi MIMURA¹

¹ *Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan,* ² *Okafuji Pediatric Clinic*

In Hyogo prefecture, Japan, influenza activity during the 2012/13 influenza season was the lowest in the past 5 seasons. Influenza A(H3N2) viruses have predominated, followed by influenza B (Victoria and Yamagata lineages) viruses. A(H1N1)pdm09 viruses have been identified less frequently.

The HA genes of A(H3N2) viruses fell into phylogenetic clade 3C including A/Victoria/361/2011 (vaccine strain) with amino acid substitution N145S. The HA gene sequences of B (Victoria lineage) viruses belonged to the B/Brisbane/60/2008 genetic clade subclade 1A. The HA genes of B (Yamagata lineage) viruses fell within genetic clade 2 or clade 3 including B/Wisconsin/01/2010 (vaccine strain).

From each samples collected from 3 patients on the same day in the hospital, both the B (Yamagata lineage) and A(H3N2) viruses have been isolated and detected at the same time. This case suggests that co-infection with influenza A and B viruses may occur frequently in the epidemic caused by the influenza virus of A and B types.

I はじめに

インフルエンザは、冬季に流行し急性の発熱や上気道炎等の呼吸器疾患を伴う感染症である。これらの症状を引き起こすインフルエンザウイルスは抗原性の違いから様々なタイプに分類され、2009年以降は、A(H1N1)pdm09, A 香港型 (以下 A(H3N2)型), B 型 Yamagata 系統及び Victoria 系統の4つのタイプが流行

している。これらのウイルスはシーズンや地域によって主流となるタイプが異なり、また、宿主の免疫から逃れるために抗原性を少しずつ変化させることから、流行するウイルスのタイプや性状変化を把握することは、次季のワクチン株を選定する上で重要である。

当所では、本県で流行するウイルスのサーベイランスを目的として、インフルエンザ様疾患患者の検体についてウイルス分離、同定、遺伝子解析等の性状解析を行っている。本稿では、2013/14 シーズンの調査結果について報告する。

¹ 感染症部 ² 岡藤小児科医院

*別刷請求先 :〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 押部 智宏

II 材料と方法

1. 検体

2013/14 シーズン (2013 年第 36 週 (9 月 2 日～8 日) から 2014 年第 35 週 (8 月 25 日～8 月 31 日)) に県内の病原体定点医療機関 (21 か所) で採取された 252 検体および小学校等の集団感染の疑いで健康福祉事務所が採取した 13 検体の合計 265 検体を材料とした。

2. インフルエンザウイルスの遺伝学的同定検査

A(H1N1)pdm09, A(H3N2) 型及び B 型ウイルスの同定は, 国立感染症研究所が示した Real-Time RT-PCR 法あるいは RT-PCR 法により行った¹⁾。

3. インフルエンザウイルスの分離

ウイルス分離は, 既報の方法に基づき²⁾, 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, 33°C, 7 日間培養した。細胞変性効果が見られた培養上清は, 0.75% モルモット赤血球あるいは 0.5% ニワトリ赤血球を用いて赤血球凝集 (HA) 試験を行った^{3,4)}。

4. インフルエンザウイルス株の同定及び抗原解析

A(H1N1)pdm09, A(H3N2) 型および B 型の同定は, 赤血球凝集抑制 (HI) 試験法を用いた^{3,4)}。標準抗血清は国立感染症研究所より分与された感染ウサギ抗血清 A/California/07/2009 (H1N1)pdm09, A/Texas/50/2012 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統), B/Massachusetts/02/2012 (Yamagata 系統) を使用した。

5. Real-Time RT-PCR 法による抗インフルエンザ薬剤耐性株の検出

国立感染症研究所が示した Real-Time RT-PCR 法 (Allelic discrimination 法) によりオセルタミビル耐性の指標となる NA タンパクの 275 番目のアミノ酸のヒスチジンからチロシンへの (H275Y) 置換を検出した¹⁾。

6. インフルエンザウイルスの遺伝子解析

RT-PCR 法により HA 遺伝子の HA1 領域あるいは NA 遺伝子を増幅し, ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定し, Neighbor-Joining 法により系統樹解析を行った。代表株の選定やクレード, サブクレードの名称等の分類は, WHO London Influenza Centre (MRC) または国立感染症研究所の報告に基づいた^{5,6)}。また, ワクチン株や代表株の HA 遺伝子の塩基配列は, GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influenza Data) のデータベース (EpiFlu™) より引用した。Fig.4～8 では, 引用した株名の横に EpiFlu™ の Isolate ID を示した。

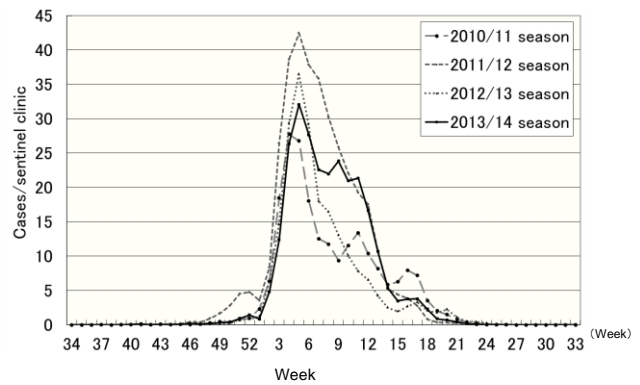


Fig. 1 Weekly cases of Influenza-like illness per sentinel clinic from 2010/11 season to 2013/14 season in Hyogo prefecture.

III 結果と考察

1. 県内のインフルエンザの流行状況

2010/11 シーズンから 2013/14 シーズンまでの感染症発生動向調査におけるインフルエンザ定点あたりの週別インフルエンザ様疾患患者報告数を Fig. 1 に示した。

定点あたりの週別患者数は, 2013 年第 52 週 (12 月 23 日～29 日) に流行開始の指標となる 1.0 人を超えたものの, 2014 年第 1 週 (12 月 30 日～1 月 5 日) に 1.0 人を一旦下回り, 第 2 週 (1 月 6 日～1 月 12 日) 以降, 再び増加した。流行のピークは 2011/12 及び 2012/13 シーズンと同じ第 5 週 (32.1 人) となった。流行の警報レベルとなる定点あたり 30 人以上を超えたのは, 2012/13 シーズンと同様に第 5 週のみであった。第 5 週以降は減少に転じたが, 第 9 週, 第 11 週に小ピークが見られ, 第 16 週及び第 17 週には増加傾向を示したものの減少を続け, 19 週 (4 月 28 日～5 月 4 日) には終息した。本シーズンの流行期間は 18 週間であった。この期間の定点あたりの累積患者数は 262 人と前シーズンの 211 人を上回り, 過去 5 シーズンでは, 2009/10, 2011/12 シーズンに次ぐ 3 番目の流行規模となった。

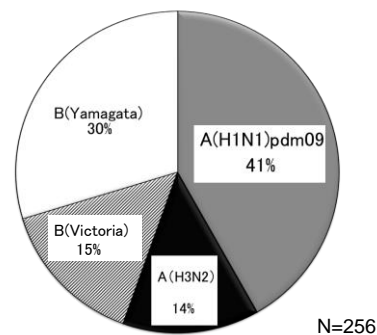


Fig. 2 Proportion of isolation/detection of influenza virus during 2013/14 season in Hyogo prefecture, Japan

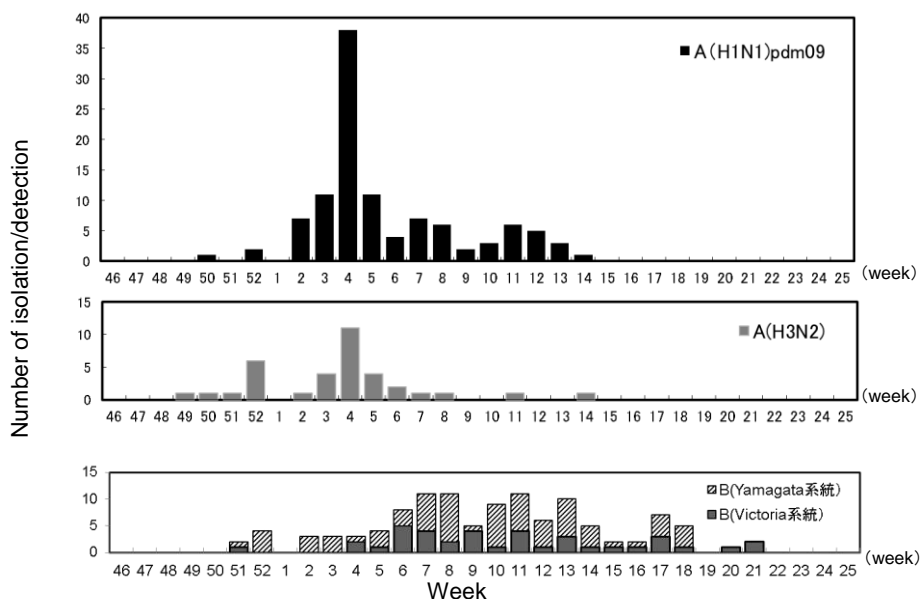


Fig. 3 Weekly isolation/detection of influenza virus during 2013/14 season in Hyogo prefecture, Japan

2. 県内のインフルエンザウイルス分離・検出状況

本シーズンのインフルエンザウイルスの分離・検出状況を Fig.2 に示した。

検査した 265 検体のうち 256 検体 (97%) からインフルエンザウイルスが検出された。この内訳は、A 型が 142 検体 (55%)、B 型が 114 検体 (45%) であり、例年よりも B 型の割合が高かった。検出された亜型(系統) は、多い順に A(H1N1)pdm09 が 107 検体 (41%)、B 型 (Yamagata 系統) が 76 検体 (30%)、A(H3N2)型が 35 検体 (14%)、B 型 (Victoria 系統) が 38 検体 (15%) であり、今シーズンは 4 つのタイプの混合流行となった。

A 型では、直近の 2 シーズンは A(H3N2)型が主流行であったが、本シーズンは A(H1N1)pdm09 と A(H3N2)型の検出割合が 3:1 となり、A(H1N1)pdm09 は 2010/11 シーズン以来の主流行となった。

B 型については、Yamagata 系統と Victoria 系統の検出割合は、直近の 2 シーズン共におおよそ 4:6 と Victoria 系統がやや多かったが、本シーズンは 2:1 と Yamagata 系統が多かった。

週別のインフルエンザウイルスの分離・検出状況を Fig.3 に示した。

A(H1N1)pdm09 は、2013 年第 50 週 (12 月 9 日～15 日) から 2014 年第 14 週 (3 月 31 日～4 月 6 日)まで第 51 週と第 1 週を除いて連続して検出された。A(H3N2)型は、2013 年第 49 週 (12 月 2 日～8 日) から 2014 年第 8 週 (2 月 17 日～2 月 23 日) まで第 1 週以外は毎週検出された。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)型は共に、第 4 週

(1 月 20 日～26 日) で検出のピークとなった。また、A(H3N2)型は、第 49 週から第 52 週までの流行開始前後に多く検出された。

一方、B 型は第 51 週 (12 月 16 日～22 日) から第 21 週 (5 月 19 日～25 日) まで第 1 週と第 19 週を除いて検出された。検出数には A 型のような明瞭なピークは形成されず、流行シーズンの後半に多く検出された。

これらの県内の患者発生とウイルスの検出状況を比較すると、流行のピークとなった第 5 週前後は A(H1N1)pdm09 と A(H3N2)型が同時に混合流行したものと考えられ、流行減少期の小ピークが形成された第 9 週と第 11 週の前後は A(H1N1)pdm09 と B 型、第 16 週と第 17 週前後の僅かな増加は B 型によるものと考えられた。

3. 抗インフルエンザ薬剤耐性株の検出

Real-Time RT-PCR 法により A(H1N1)pdm09 ウイルス 63 株中 2 株 (3.2%) に抗インフルエンザ薬剤耐性変異とされる H275Y 置換株が検出された。これらの株を国立感染症研究所で化学発光法による薬剤感受性試験を行ったところ、A/HYOGO/1218/2014 株は、感受性株と比較してオセルタミビルに対して感受性対照株の約 1700 倍、ペラミビルは約 650 倍感受性が低下していたが、ザナミビル、ラミナミビル感受性であった。同様に、A/HYOGO/1190/2014 株は、オセルタミビルに対して感受性対照株の約 240 倍、ペラミビルは約 680 倍感受性が低下していたが、ザナミビル、ラミナミビルに対しては

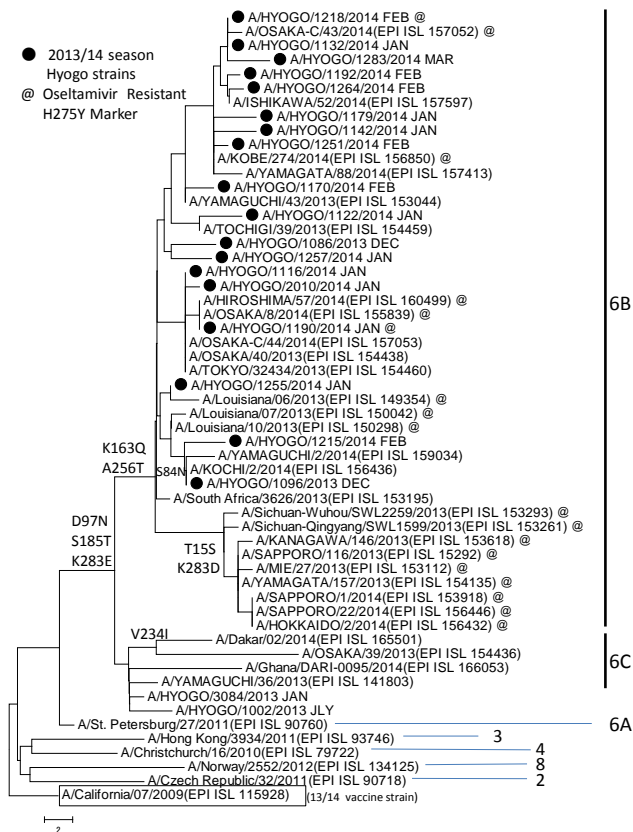


Fig. 4 Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1)pdm09 HA genes (HA1)

感受性であった。

本シーズンは流行の前半に札幌市を中心として抗インフルエンザ薬剤耐性 A(H1N1)pdm09 の地域的な流行が認められ、三重県や山形県等でも札幌市の株と由来が同一とみられる耐性株が検出された^{8),9)}。全国の調査では本シーズンの耐性ウイルスの検出率は 4.1%と例年よりも高くなっており¹⁰⁾、次シーズン以降の流行株の動向を注視する必要がある。

4. 県内分離ウイルス株の遺伝子解析

A(H1N1)pdm09 ウイルス分離株の HA タンパク (HA1 領域) の遺伝子系統樹解析の結果を Fig.4 に示した。

A(H1N1)pdm09 ウイルスは現在クレード 1~8 に区分され、クレード 6 はさらにサブクレード 6A, 6B, 6C に分類される⁶⁾。今回我々が解析した 18 株は、全て D97N, S185T 及び K283E のアミノ酸置換を持ち、さらに K163Q と A256T のアミノ酸置換を持つクレード 6B であった。国立感染症研究所による国内分離株の解析では、V234I 置換を持つクレード 6C に属する株が一部報告されているものの、主流はクレード 6B であり県内分離株と同様の結果であった。また、HA タンパクの Sa 抗原領域で 153-157 番目のアミノ酸置換した抗原変異株は、県内分離株からは検出されなかった。

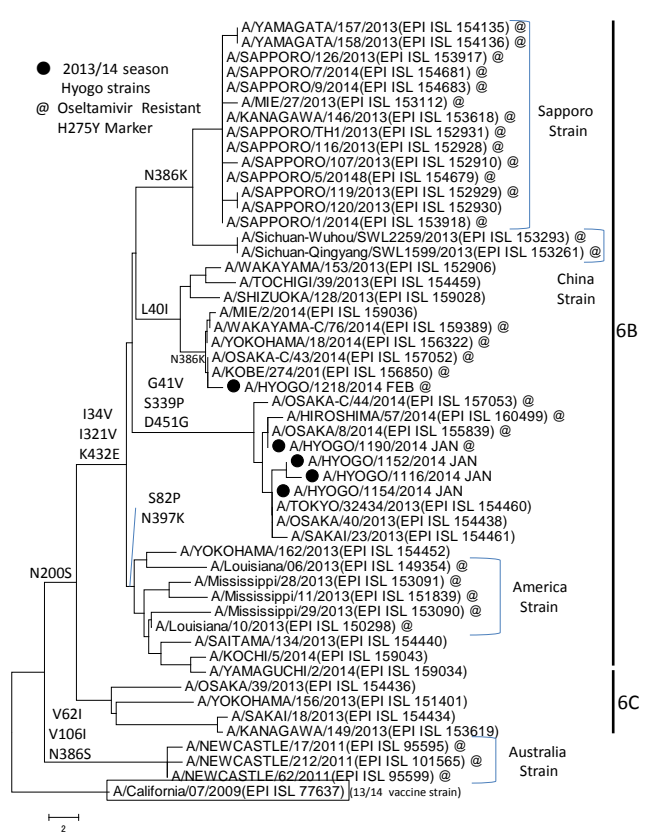


Fig. 5 Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1)pdm09 NA genes

A(H1N1)pdm09 ウイルス分離株の NA タンパクの遺伝子系統樹解析の結果を Fig.5 に示した。

NA タンパクの I34V, I321V 及び K432E の置換を特徴とするクレード 6B は、さらに N386 K 置換のクラスター、L40I を持つクラスター、G41V, S339P 及び D451G のクラスター、S82P 及び N397K を持つクラスターの 4 クラスターに分類された⁶⁾。

今回解析した県内分離の 5 株は、L40I のクラスター、または、G41V, S339P 及び D451G を持つクラスターに属し、このうち耐性株である A/HYOGO/1218/2014 株は、神戸市、大阪市、横浜市及び和歌山市で検出された耐性株と同じ L40I 置換のクラスターに属した。一方、A/HYOGO/1190/2014 株は、大阪府、広島県及び大阪市で分離された耐性株と同じ G41V, S339P 及び D451G のクラスターに属していた。

今回、本県で分離された薬剤耐性株は、Fig.5 に示したとおり地域流行が見られた札幌株や 2014 年 1 月に複数検出された中国株が属するクラスター、米国のルイジアナ州、ミシシッピ州の耐性株が属するクラスター、豪州で地域流行したいずれの耐性株のクラスターにも属していないことから、これらの地域で流行した耐性株と由来が異なるものと考えられた。

A/HYOGO/1190/2014 株の HA 遺伝子 (HA1 領域) の

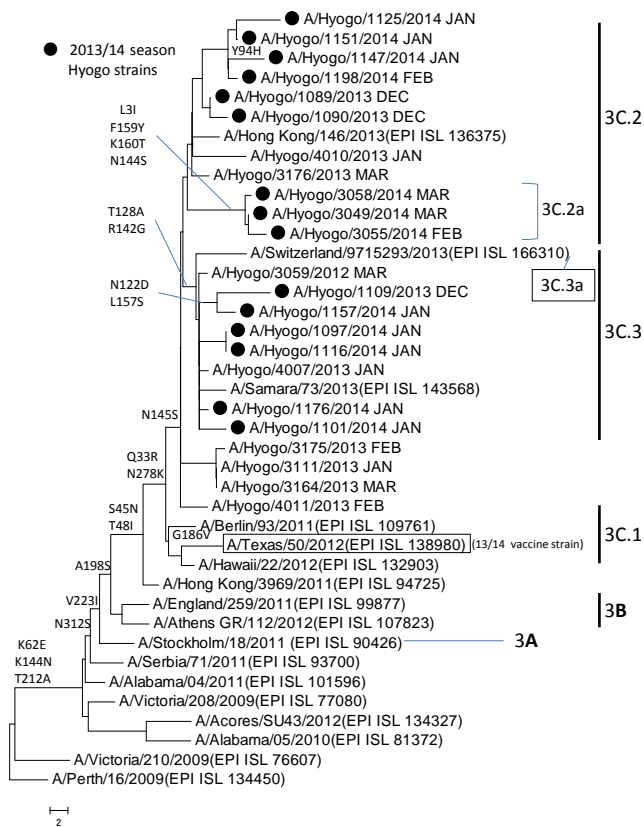


Fig. 6 Phylogenetic analysis of influenza A(H3N2) HA genes (HA1)

比較では、大阪府の A/OSAKA/8/2014 株及び広島県の A/HIROSHIMA/57/2014 耐性株と一致した。この広島株は、日本国内で初めて検出された NA タンパクに H275Y/I223R の二重耐性置換を持つ株で、オセルタミビルに対して感受性が約 12,000 倍、ペラミビルに対して約 5,500 倍、ザナミビル及びピラミナミビルに対して約 20 倍低下している¹¹⁾。兵庫株の NA 遺伝子は塩基配列が A/OSAKA/8/2014 株と全て一致しており、I223R 置換を有する広島株とは 668 番目の T→G の 1 塩基のみの変異があるだけで、大阪及び広島の耐性株と由来が同一であると考えられた。今回、同一由来とみられる耐性株が西日本の 3 つの都市から同時期に検出されたことから、これらの株が西日本地域を中心に繰り返し伝播され、その中で広島株は I223R の薬剤耐性置換を獲得したことが考えられた。

本シーズンは流行当初に札幌で耐性株の地域流行があったことから、これらの流行が危惧されたが全国的な広がりは見られなかった。しかしながら、過去にオセルタミビル耐性のソ連型 A(H1N1) ウイルスが短期間で世界的に流行したこともあり、今後とも二重耐性変異を含めた耐性株の出現に注意する必要がある。

A(H3N2)型ウイルス分離株の HA タンパク (HA1 領域) の遺伝子系統樹解析の結果を Fig. 6 に示した。

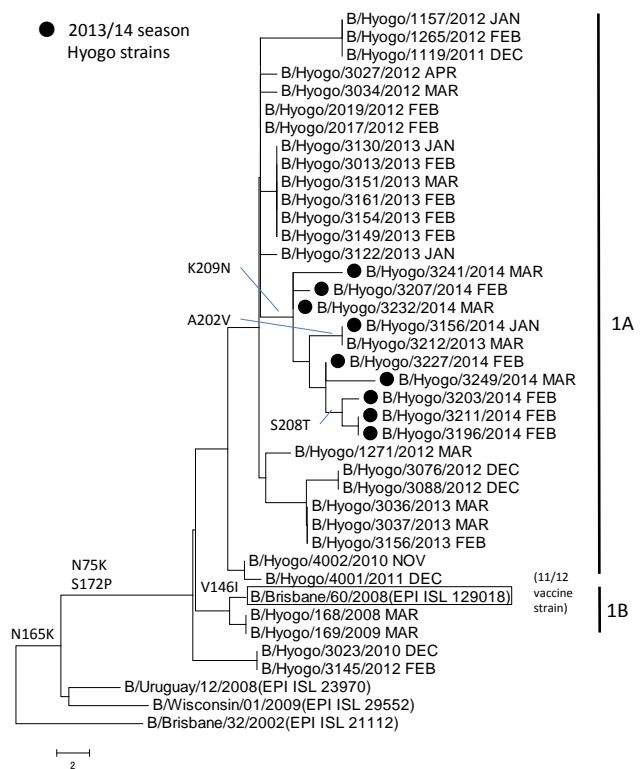


Fig. 7 Phylogenetic analysis of influenza B (Victoria-lineage) HA genes (HA1)

2 シーズン前の県内の分離株は、V223I 置換を特徴とするクレード 3 が主流であり¹²⁾、前シーズンはさらに S45N と T48I のアミノ酸置換を特徴とするクレード 3C が主流であった¹³⁾。今シーズンはクレード 3C が 3C.1, 3C.2, 3C.3 のサブクレードに派生し、さらに 3C.2 には 3C.2a が、3C.3 は 3C.3a が追加された⁶⁾。

今回解析した 15 株のうち 9 株はサブクレード 3C.2 に属し、このうちの 3 株は 3C.2a に分類された。残りの 6 株は 3C.3 に属しており、3C.3a に分類される株はなかった。3C.2a を検出した株の検体の採取時期は、シーズン後半の 2 月及び 5 月であった。国内の解析では、シーズン後半に 3C.2a や 3C.3a に属する株が分離され、これらの株は A/Tokyo/31512/2013 株 (2014/15 シーズンのワクチン株 A/New York/39/2012 株類似株) に対して 2~8 倍の HI 試験の反応性の低下がみられたことから⁶⁾、これらのサブクレードに属する抗原変異株の分離動向に注意が必要である。

B 型 Victoria 系統分離株の HA タンパク (HA1 領域) の遺伝子系統樹解析結果を Fig. 7 に示した。

Victoria 系統は、Brisbane/60 クレードのサブクレード 1A と L58P 置換を持つサブクレード 1B に分類される⁶⁾。3 シーズン前は、サブクレード 1A と 1B が混在したが¹⁴⁾、2 シーズン前からの分離株は、すべて Brisbane/60 クレードのサブクレード 1A であった^{12),13)}。

IV 要 旨

兵庫県における 2013/14 シーズンのインフルエンザの流行は、過去 5 シーズンで 3 番目の規模となり、A(H1N1)pdm09, A(H3N2)型, B 型 Victoria 系統と Yamagata 系統のウイルスの混合流行であった。

2010/11 シーズン以来の A(H1N1)pdm09 が主体となる流行であった。抗インフルエンザ薬剤耐性 A(H1N1)pdm09 ウイルスは、63 株中 2 株 (3.2%) が検出された。系統樹解析の結果、兵庫株は地域流行した札幌株とは由来が異なるものと考えられた。

A(H1N1)pdm09 ウイルスの系統樹解析からクレード 6B に属することが分かり、A(H3N2)型ウイルスは 3C2 クレードに属した。B 型 Victoria 系統の分離株の系統樹解析の結果、すべてサブクレード 1A に属した。B 型 Yamagata 系統の分離株では、HA 遺伝子の系統樹解析では、クレード 2 と 3 に属した。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、検体採取、連絡調整にご協力いただきました県疾病対策課、県下の健康福祉事務所ならびに病原体定点医療機関に深謝致します。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：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 2 版) (2012)
- 2) 山岡政興, 押部智宏, 稲元哲朗:A 香港型インフルエンザウイルスのキモトリプシン存在下での MDCK 細胞による分離について. 兵庫県立健康環境科学研究所センター紀要, 4, 54-57 (2007)
- 3) 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, 287~330 (1982)
- 4) 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)
- 5) WHO influenza centre London : Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere interim-report-feb-2014: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2014.pdf>
- 6) 国立感染症研究所感染症疫学センター : IASR 病原

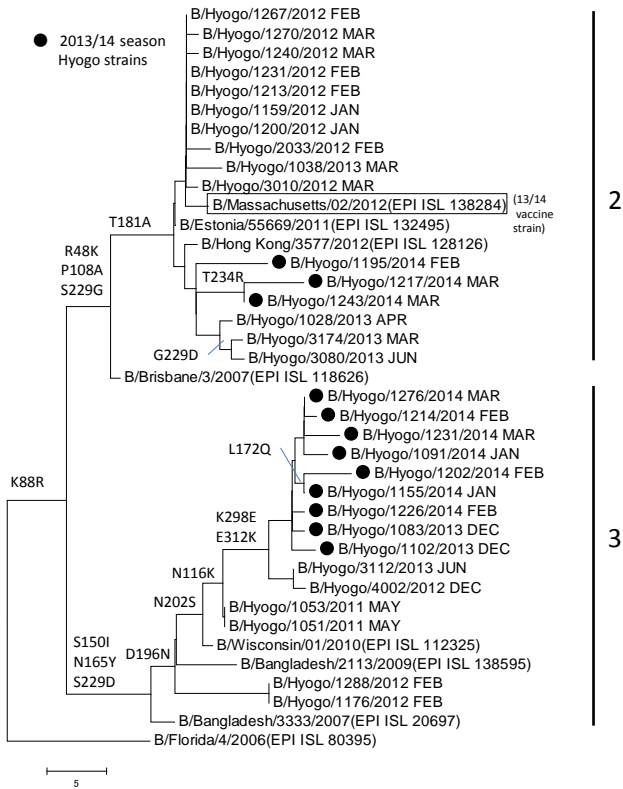


Fig. 8 Phylogenetic analysis of influenza B (Yamagata-lineage) HA genes(HA1)

本シーズンの分離株 9 株は全てサブクレード 1A に属しており、3 シーズン連続してサブクレード 1A の株が主流となった。また、本シーズンの分離株は、すべて K209N のアミノ酸置換を伴っていた。

B 型 Yamagata 系統の分離株のウイルス分離株の HA タンパク (HA1 領域) の遺伝子系統樹解析の結果を Fig. 8 に示した。

Yamagata 系統の B/Florida/4/2006 株を代表とするクレード 1, R48K, P108A, T181A 及び S229G のアミノ酸置換が特徴のクレード 2, S150I, N165Y 及び S229D のアミノ酸置換を持つクレード 3 に区分されるが⁶⁾, 前シーズンはクレード 2 と 3 に属する株が混在しており¹³⁾, クレード 2 の割合が高かった。

本シーズンの分離株 12 株は、前シーズンと同様にクレード 2 と 3 に属する株が混在したものの、クレード 2 が 3 株、クレード 3 の株が 9 株とクレード 3 の株の方が優勢であった。

全国の解析でも、クレード 3 が 72%, クレード 2 が 28%となっており⁶⁾, 県内の比率と同様であった。また、国内株の解析で、クレード 3 の株に Yamagata 系統と Victoria 系統のリアソータント株 (HA : Yamagata 系統, NA : Victoria 系統) の検出が報告されたが⁶⁾, 当所のクレード 3 の 9 株には、リアソータントは認められなかった。

- 7) 微生物検出情報 (月報), **35**, 第 11 号, 254-258 (2014)
- 8) 国立感染症研究所感染症疫学センター: IASR 病原微生物検出情報 (月報), **35**, 第 2 号, 42-43 (2014)
- 9) 国立感染症研究所感染症疫学センター: IASR 病原微生物検出情報 (月報), **35**, 第 2 号, 43-45 (2014)
- 10) 国立感染症研究所感染症疫学センター: IASR 病原微生物検出情報 (月報), **35**, 第 3 号, 76-78 (2014)
- 11) 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター: 抗インフルエンザ薬剤耐性サーベイランス 2015 年 1 月 28 日: <http://www.nih.go.jp/niid/images/flu/resistance/20150122/dr13-14j20150122-1.jpg>
- 12) 国立感染症研究所感染症疫学センター: IASR 病原微生物検出情報 (月報), **35**, 第 7 号, 176-177 (2014)
- 13) 押部智宏, 榎本美貴, 高井伝仕, 岡藤輝夫ほか: 兵庫県における 2011/12 シーズンのインフルエンザウイルス分離株の性状解析. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, **4**, 6-12 (2013)
- 14) 押部智宏, 榎本美貴, 高井伝仕, 岡藤輝夫ほか: 兵庫県における 2012/13 シーズンのインフルエンザウイルス分離株の性状解析. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, **5**, 17-23 (2014)
- 15) 押部智宏, 榎本美貴, 高井伝仕, 岡藤輝夫ほか: 兵庫県における 2010/11 シーズンのインフルエンザウイルス分離株の性状解析. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, **3**, 5-10 (2012)

[平成 27 年 3 月 30 日受理]

