

[ノート]

兵庫県における 2014/15 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 望月 利洋¹

Characteristic Analysis of the Seasonal Influenza Viruses in Hyogo Prefecture, Japan, during the 2014/15 Season

Tomohiro OSHIBE^{1*}, Miki OGI¹, Densi TAKAI¹, Masatsugu CHIKAHIRA¹,
Teruo OKAFUJI² and Toshihiro MOCHIZUKI¹

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 2014/15 influenza season was the second largest in the past 5 seasons. Influenza A(H3N2) viruses predominated, followed by influenza B (Yamagata lineages) viruses. A(H1N1)pdm09 and B (Victoria lineages) viruses were identified less frequently. From the sample collected from a patient in a hospital, both the B (Yamagata lineage) and A(H3N2) viruses were detected at the same time.

The HA genes of A(H3N2) viruses fell into the phylogenetic clades 3C2a (79%) and 3C3a (21%). The HA genes of B (Yamagata lineage) viruses fell within the genetic clade 3 including B/Phuket/3073/2013 (2015/16 season vaccine strain). The HA gene sequences of B (Victoria lineage) viruses belonged to the B/Brisbane/60/2008 genetic clade subclade 1A. The HA genes of A(H1N1)pdm09 viruses fell into the genetic group 6B.

I はじめに

インフルエンザは、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。これらの症状の原因となる季節性のインフルエンザウイルスは抗原性の違いから、2009年にパンデミックを引き起こしたA(H1N1)pdm09, A 香港型 (以下 A(H3N2)型), B 型 Yamagata 系統及び Victoria 系統の4つのタイプに分類される。これらのウイルスは時期や地域により流行状況が異なり、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ながら流行を繰り返している。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必須の情報である。

当所では、本県で流行するインフルエンザ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、2014/15シーズンの調査結果について報告する。

II 材料と方法

1. 検体

2014/15シーズン (2014年第36週 (9月1日~7日) から2015年第35週 (8月24日~8月30日)) に県内の病原体定点医療機関 (21か所) で採取された231検体及び小学校等での集団感染の疑い事例で健康福祉事務所が採取した1検体の合計232検体を材料とした。

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

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 (CPE) がみられた培養上清は、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

A(H1N1)pdm09, A(H3N2)型及び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/NewYork/39/2012 (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置換 (H275Y) 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領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、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. 4~7では、引用した株名の横に EpiFlu™ の Isolate IDを示した。

III 結果と考察

1. 県内のインフルエンザの流行状況

2011/12シーズンから本シーズンまでの感染症発生動向調査における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。

週別定点あたりの患者数は、2014年第49週 (12月1日

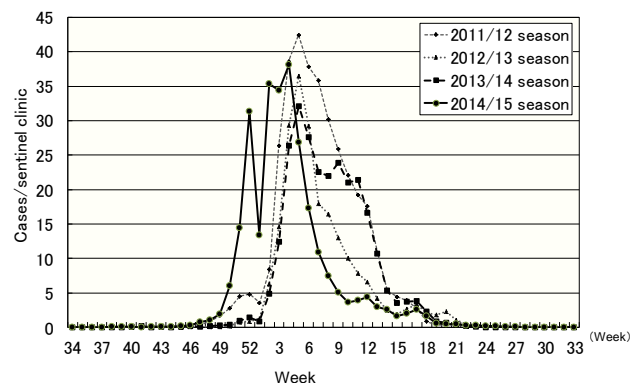


Fig. 1 Weekly cases of Influenza-like illness per sentinel clinic from 2011/12 season to 2014/15 season in Hyogo prefecture, Japan.

~7日) に流行開始の指標となる1.0人を超えた。その後急速に増加し2014年第52週 (12月22日~28日) に警報水準とされる定点あたり30人を超え、2010/11シーズン以降、最も早い流行の立ち上がりとなった。警報水準を超える流行は第1週 (12月29日~1月4日) を除く第4週 (1月19日~25日) まで持続し、流行のピークは同じく第4週 (38.1人) となった。その後は減少に転じて第12週 (3月16日~22日) に小ピークが見られたものの、第18週 (4月27日~5月3日) まで患者数1.0以上が持続した。本シーズンの流行期間は22週間となり、この期間の定点あたりの累積患者数は267人と過去5シーズンで2011/12シーズンの350人に次いで2番目に多かった。

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232検体のうち219検体 (94%) からインフルエンザウイルスが検出され、このうちの1検体からA型及びB型ウイルスが重複して検出されたため、合計 220

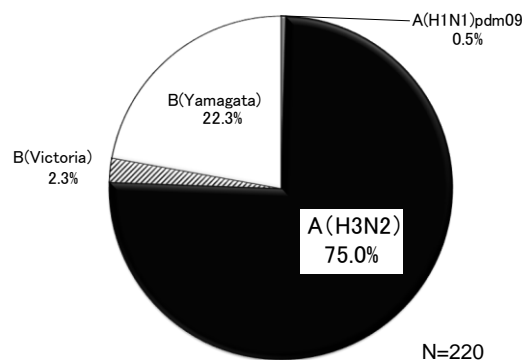


Fig. 2 Proportion of isolation/detection of influenza virus during 2014/15 season in Hyogo prefecture, Japan

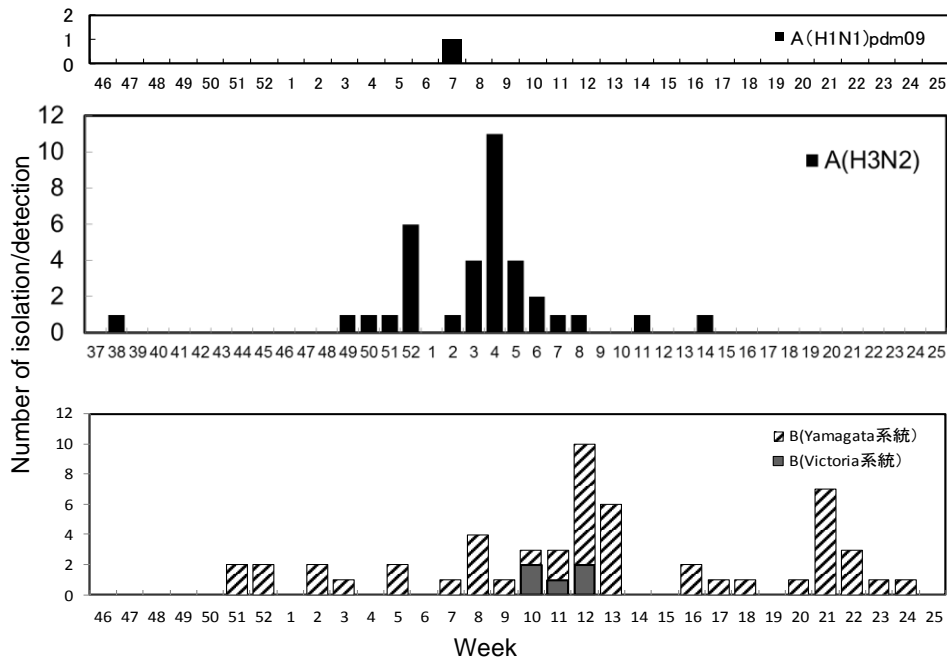


Fig. 3 Weekly isolation/detection of influenza virus during 2014/15 season in Hyogo prefecture, Japan

件となった。内訳は、A型が166件（75.5%）、B型が54件（24.5%）であり、検出された亜型（系統）は、多い順にA(H3N2)型が165件（75.0%）、B型（Yamagata系統）が49件（22.3%）、B型（Victoria系統）が5件（2.3%）、A(H1N1)pdm09が1件（0.5%）であった。今シーズンはA(H3N2)型とB型（Yamagata系統）が大半を占め、主に2種類のウイルスによる混合流行となった。

過去3シーズンのA型は、2011/12シーズン及び2012/13シーズンはA(H3N2)型、2013/14シーズンはA(H1N1)pdm09が主流であり、本シーズンは2シーズンぶりのA(H3N2)型の主流となった。

B型のYamagata系統とVictoria系統の検出割合は、2011/12シーズン及び2012/13シーズンでは約2:3とVictoria系統が多かったものの、2013/14シーズンは2:1、本シーズンは10:1と直近の2シーズンはYamagata系統が多い結果となった。

3. 週別のインフルエンザウイルスの分離・検出状況

A(H1N1)pdm09は、2015年第7週（2月9日～15日）に1検体から検出された（Fig. 3）。A(H3N2)型は、2014年第38週（9月14日～20日）に1検体から検出され、2014年第49週（12月1日～7日）から2015年第8週（2月16日～2月22日）まで第1週以外は連続して検出され、第4週（1月19日～25日）に検出のピークとなった。

一方、B型は第51週（12月15日～21日）から第24週（6月8日～14日）まで第1週、第4週、第14週、第15週を除いて検出された。検出が最も多かったのは第12週（3月

16日～22日）で、次いで第21週（5月18日～24日）であった。このうちVictoria系統は第10週から第12週にかけて検出された。第21週のピークは、淡路地域で採取された検体が多く、地域的な流行が原因と考えられた。

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4週前後はA(H3N2)型が主体であったと考えられ、流行減少期の小ピークが形成された第12週前後はB型、特にYamagata系統が主体であったと考えられた。

Real-Time RT-PCR法によりA(H1N1)pdm09ウイルス株1株の抗インフルエンザ薬耐性株を調査した結果、H275Y置換は認められなかった。

4. A型及びB型インフルエンザウイルスの重複感染例

2015年第5週に発熱（38.1℃）、上気道炎などのインフルエンザ様の症状を呈した11歳の男児から採取された検体が、インフルエンザ簡易キットの検査でA型、B型が共に陽性となった。当所でウイルス分離を行ったところ、MDCK細胞に接種後、4日目にCPEが出現し、HA価は128倍となった。HI試験を行った結果、B/Massachusetts/02/2012（Yamagata系統）抗血清（ホモ価640倍）に対して80倍、A/California/07/2009（H1N1)pdm09（同1280倍）、A/NewYork/39/2012（H3N2）（同1280倍）及びB/Brisbane/60/2008（Victoria系統）（同640倍）に対して10倍未満であった。

一方、検体から直接Real-Time RT-PCR法でインフルエンザウイルス遺伝子を検出したところ、A(H3N2)型

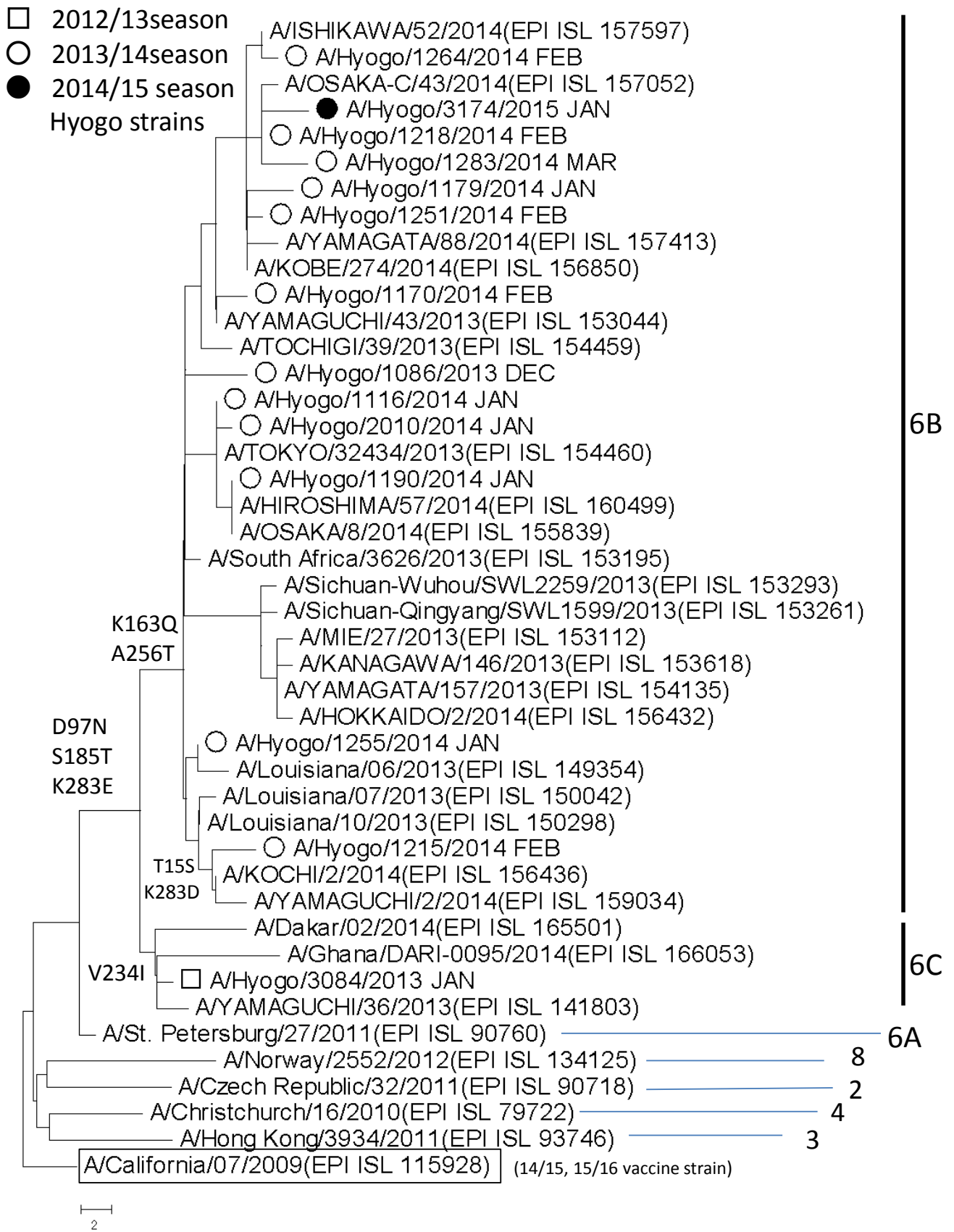


Fig. 4 Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1)pdm09 HA genes (HA1)

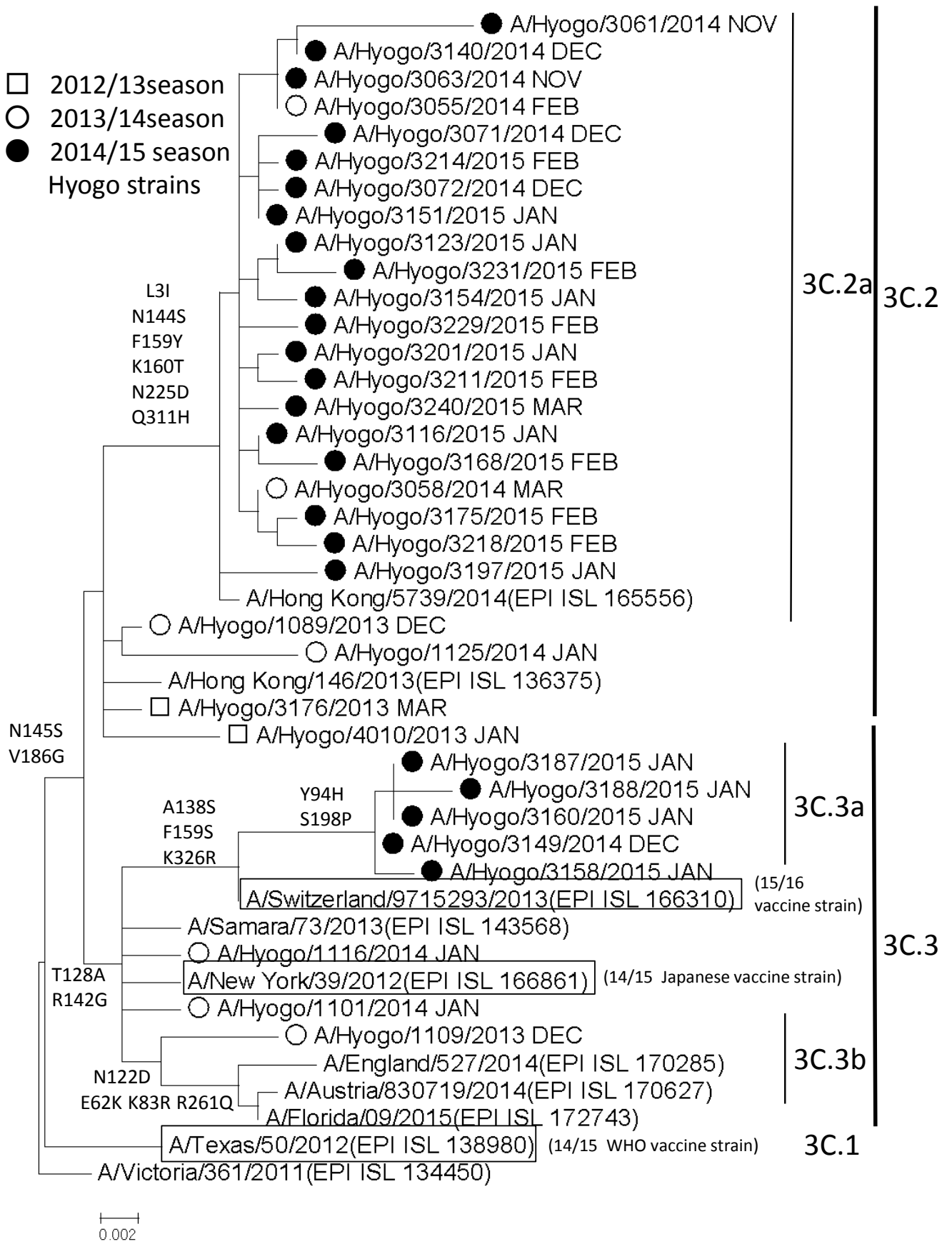


Fig. 5 Phylogenetic analysis of influenza A(H3N2) HA genes (HA1)

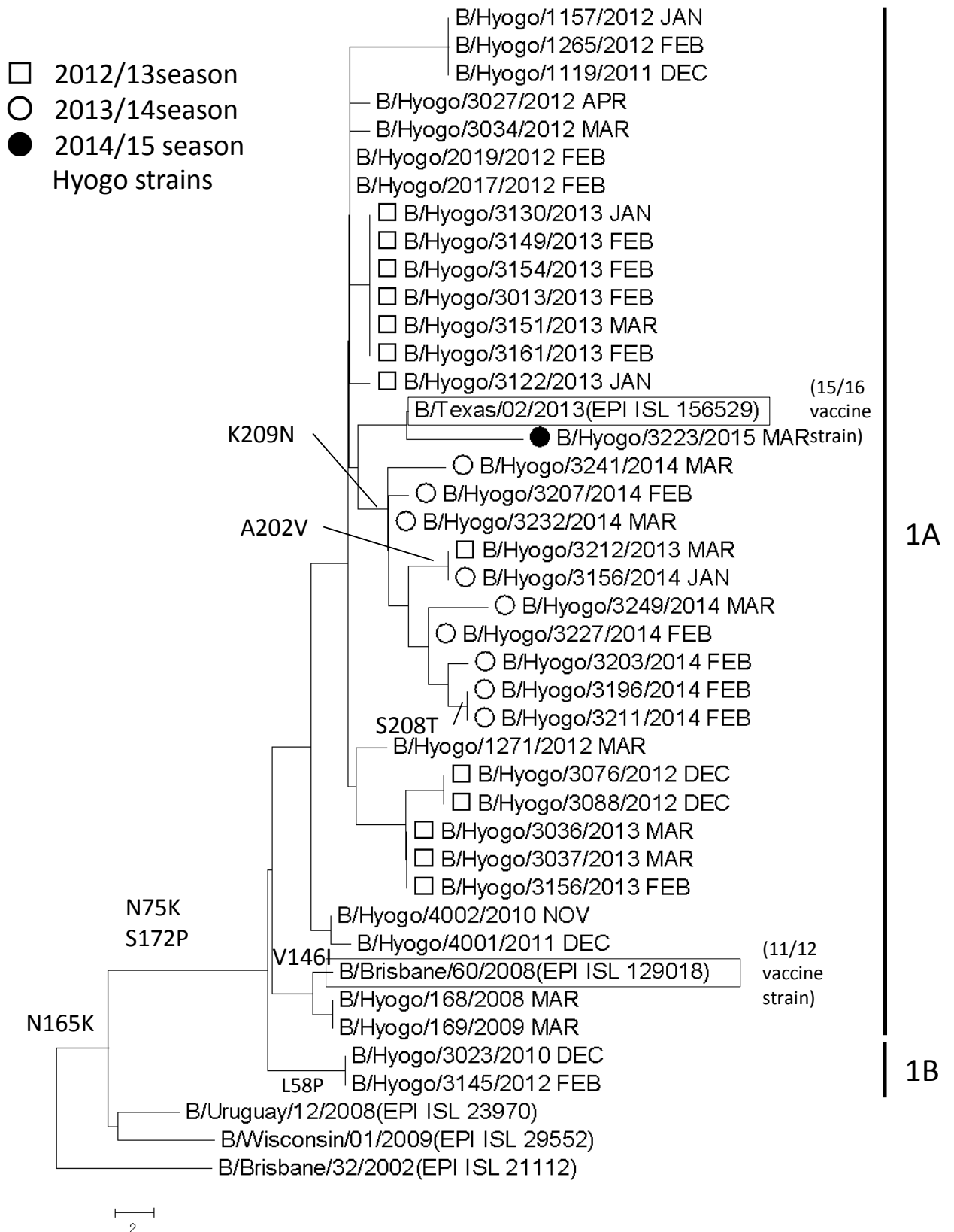


Fig. 6 Phylogenetic analysis of influenza B (Victoria-lineage) HA genes (HA1)

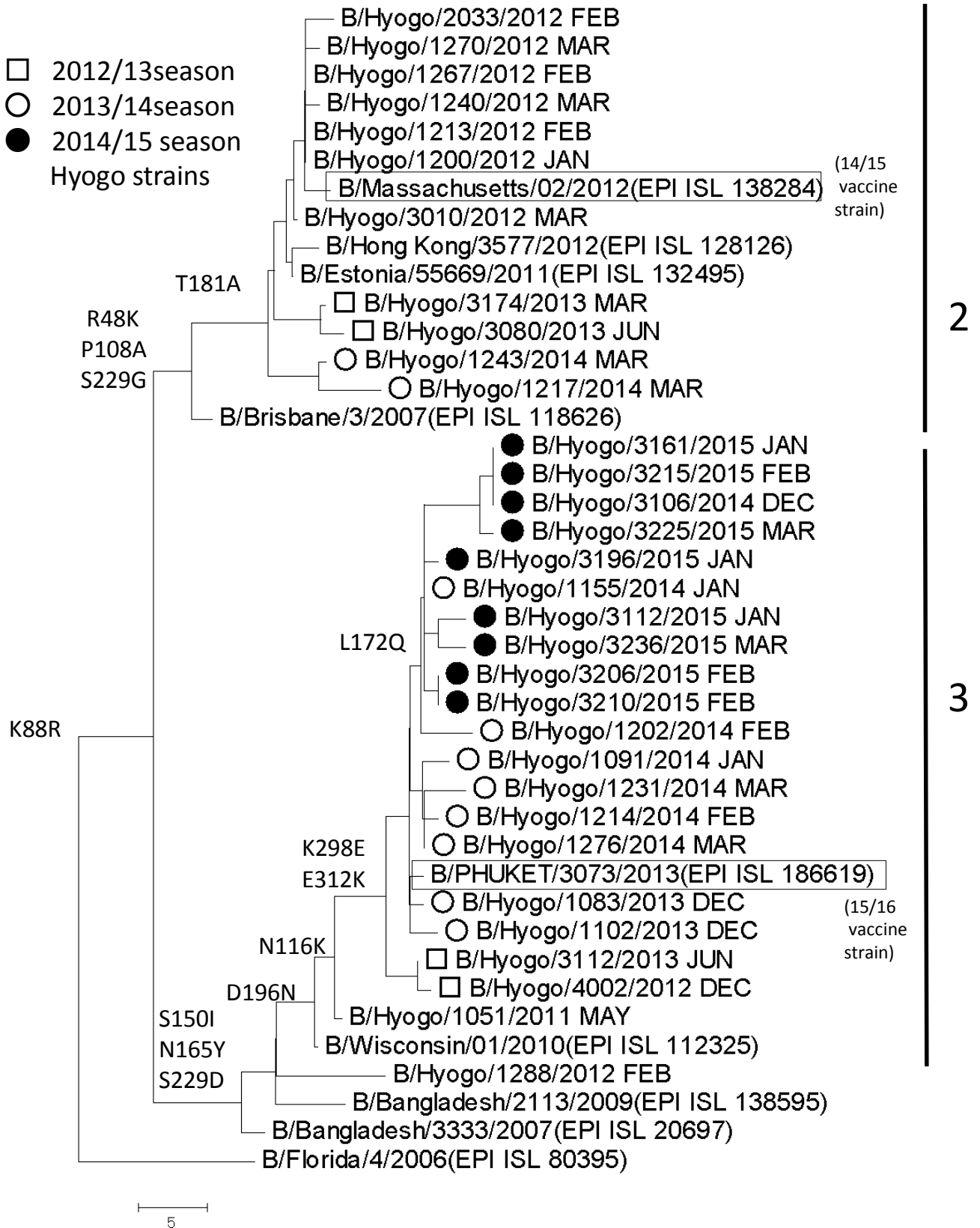


Fig. 7 Phylogenetic analysis of influenza B (Yamagata-lineage) HA genes (HA1)

遺伝子が陽性でCt (Threshold Cycle) 値は25.8, B型遺伝子が陽性でCt 値は22.9となったことから, A(H3N2) 型とB型 (Yamagata系統) の重複感染と判定した。

今回の検体が採取された2015年第5週は, Fig. 3に示したとおりA(H3N2) 型が優勢であったものの, B型 (Yamagata系統) も検出されており, 双方のウイルスが流行していたと思われる。今回の事例は, このような流行状況で重複感染となったものと考えられた。ウイルス分離同定の結果では, B型 (Yamagata系統) のみが陽性となったが, これは近年, A(H3N2) 型ウイルスは, 赤血球凝集反応が著しく低下した株が大半を占めていることから, B型 (Yamagata系統) のウイルスが優先的に同定されたものと考えられた。

一般に簡易キットでA型, B型が同時に陽性となった場合は偽陽性と判定されることが多いが, A型, B型が同時に流行している時期に判定をする場合は, 重複感染も考慮するべきと考えられる。

5. 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, 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⁾。2013/14シーズンに解析した18株は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⁸⁾。本シーズンに唯一分離された1株も, 同じ6Bクレードに属しており, 前のシーズンと比較してHA1領域に大きな変異が見られていないことが判明した。国立感染症研究所による国内分離株の解析でも, 全てクレード6Bに属しており県内分離株と同様の結果であった⁶⁾。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検出されなかった。

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. 5に示した。

県内のA(H3N2)型ウイルス株は, 2012/13シーズン以降S45NとT48Iのアミノ酸置換を特徴とするクレード3Cが主流となり⁷⁾, 2013/14シーズンに入りクレード3Cが3C.1 (代表株:A/Texas/50/2012), 3C.2, 3C.3のサブクレードに派生した⁸⁾。さらに 3C.2はL3I, N144S, F159Y, K160T, N255D, Q311Hのアミノ酸置換を有する3C.2aのサブグループが分岐して, 3C.3はA138S, F159S, N225Dのアミノ酸置換を有する3C.3aと E62K, K83R, N122Dのアミノ酸置換を有する3C.3bのサブグループが追加された⁸⁾。

今回解析した24株のうち19株 (79%) はサブグループ

3C.2aに分類された。残りの6株は3C.3aに分類され, 3C.3bに属する株は検出されなかった。3C.2aに属する株は, 本県では2013/14シーズンの後半から検出され始め, 本シーズンは流行初期から全期間を通じて最も多く検出された。全国の結果でも, 2015年2月以降に分離された分離株は3C.2aに属する株が92%を占めており⁶⁾, 県内と同様の結果であった。

一方, 国立感染症研究所による抗原性解析では, 3C.2aや 3C.3aに属する分離株はA/Tokyo/31512/2013株 (2014/15シーズンのワクチン株A/NewYork/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示されており⁹⁾, 3C.2aの株が大半を占めた本シーズンの7割以上の解析株は, ワクチン株に対して乖離が認められた⁶⁾。これと同様に3C.2aの株が大半を占めた県内分離株についてもワクチン株に対して乖離があったものと考えられた。

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. 6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⁾。県内の2012/13シーズンの分離株は, すべてBrisbane/60クレードのサブクレード1Aであり⁷⁾, 2013/14シーズンの分離株も全てサブクレード1Aに属した⁸⁾。本シーズンに唯一分離された1株も同じく1A属しており, 解析したHA1領域では前のシーズンと比較して大きな変異は認められなかった。

B型 (Yamagata系統) 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. 7に示した。

Yamagata系統は, 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⁶⁾。県内の分離株は, 2012/13シーズンはクレード2と3が混在しており, クレード2が多かった⁷⁾。2013/14シーズンの分離株は, 2012/13シーズンと同様にクレード2と3が混在したものの, クレード3が優勢であった⁸⁾。本シーズンの分離株は解析した9株全てがクレード3に属した。

全国の解析でも, 本シーズンは全てクレード3に属しており⁶⁾, 県内と同様の結果であった。また, 国内株の解析では, 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⁾, 当所で解析した9株にリアソータント株は認められなかった。

IV 要 旨

兵庫県における2014/15シーズンのインフルエンザの流行は、過去5シーズンで2番目の規模となり、主にA(H3N2)型及びB型 (Yamagata系統) ウイルスの混合流行であった。また、A(H3N2)型及びB型 (Yamagata系統) ウイルスの重複感染例が1例認められた。

遺伝子系統樹解析の結果、A(H3N2)型ウイルスの79%は、3C2aクレードに属した。B型 (Yamagata系統) の分離株では、全てクレード3に属した。A(H1N1)pdm09ウイルスは、系統樹解析からクレード6Bに属し、B型 (Victoria系統) はサブクレード1A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兵庫県疾病対策課、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3版) (2014)
- 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。国立予防衛生研究所学友会編, ウイルス実験学各論, 改訂二版, p. 287-330, 丸善, 東京 (1982)
- 4) 根路銘国昭：インフルエンザウイルス。厚生省監修, 微生物検査必携 ウイルス・クラミジア・リケッチア検査, 第3版, 第II分冊 各論1, p. 2-24, 日本公衆衛生協会, 東京 (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-2015: <https://www.crick.ac.uk/media/221813/nimr-report-feb2015-web.pdf>
- 6) 国立感染症研究所感染症疫学センター：インフルエンザ 2014/15 シーズン。IASR 病原微生物検出情報 (月報), **36**, (11), 199-207 (2015)
- 7) 押部智宏, 榎本美貴, 高井伝仕, 近平雅嗣, 岡藤輝夫, 岡本康子, 三村昌司：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。兵庫健科セ研究報告, **5**, 17-23 (2014)
- 8) 押部智宏, 萩美貴, 高井伝仕, 近平雅嗣, 岡藤輝夫, 三村昌司：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分離株の性状解析。兵庫健科セ研究報告, **6**, 5-10 (2015)
- 9) 国立感染症研究所感染症疫学センター：インフルエンザ2013/14シーズン。IASR病原微生物検出情報 (月報), **35**, (11), 251-258 (2014)

(平成28年2月22日受理)