

[ノート]

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の性状解析

押部 智宏^{*1} 荻 美貴¹ 高井 伝仕¹ 近平 雅嗣¹岡藤 輝夫² 岡本 泰子³ 三村 昌司¹Characteristic Analysis of the Epidemic Influenza Viruses in Hyogo
Prefecture, Japan during 2012/13 SeasonTomohiro OSHIBE^{*1}, Miki OGI¹, Densi TAKAI¹, Masatsugu CHIKAHIRA¹,Teruo OKAFUJI², Yasuko OKAMOTO³ 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, ³ Okamoto 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).

Both the B (Yamagata lineage) and A(H3N2) virus have been isolated and detected from each samples collected from 3 patients on the same day in same hospital. It was thought that co-infection with influenza A and B viruses may occur frequently in the epidemic of caused by the influenza virus of A and B type.

I はじめに

インフルエンザは毎年冬季を中心に流行し、急性の発熱や上気道炎等の呼吸器疾患を起こす感染症である。これらの症状の原因となる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、A(H1N1)pdm09、A 香港型 (以下 A(H3N2)型)、B 型 Yamagata 系統および Victoria 系統が流行している。それ

ぞれのウイルスはシーズンによって流行規模が異なるため、流行ウイルスのタイプや性状を把握することは、次季のワクチン株を選定する上で重要である。

また、2013年3月に中国で初めて鳥インフルエンザ A(H7N9)型ウイルスのヒト感染例¹⁾が報告され、東南アジアを中心とした鳥インフルエンザ A(H5N1)型ウイルスの感染例²⁾や米国でのブタインフルエンザ A(H3N2)v 型ウイルスの感染例^{3),4),5)}が散発的に報告されており、このような鳥やブタに由来するウイルスのヒト感染例についても、新型インフルエンザウイルスの出現を監視する観点から、発生動向に注視する必要がある。

当所では、兵庫県内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、インフルエンザ様患

¹感染症部 ² 岡藤小児科医院 ³ 岡本医院

*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

者の検体からウイルス分離同定、遺伝子解析等の性状解析を行っている。本稿では、2012/13 シーズンのインフルエンザの流行状況と共に定点医療機関に受診した患者からのウイルス分離同定および遺伝子解析結果について述べる。さらに本調査で明らかとなった A 型および B 型インフルエンザウイルスの重複感染例についても報告する。

II 材料と方法

1. 検体

2012/13 シーズン (2012 年第 36 週 (9 月 3 日～9 日) から 2013 年第 35 週 (8 月 26 日～9 月 1 日)) に県内の病原体定点医療機関 (21 か所) で採取された 203 検体および施設の集団感染の疑い等で健康福祉事務所が採取した 14 検体の合計 217 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

A(H1N1)pdm09, A(H3N2)型および B 型ウイルスの同定は、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)」(国立感染症研究所) に準じて Real-Time RT-PCR 法あるいは RT-PCR 法により行った。

3. インフルエンザウイルスの分離

採取した咽頭ぬぐい液を 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⁶⁾。細胞変性効果 (CPE) がみられた培養上清は、0.75%モルモット赤血球を用いて赤血球凝集 (HA) 試験を行った^{7,8)}。

4. インフルエンザウイルス株の同定

ウイルスの 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^{7,8)}。標準抗血清は国立感染症研究所より分与されたウサギ抗血清 A/California/07/2009A(H1N1)pdm09, A/Victoria/210/2009 A(H3N2), B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統)および B/Wisconsin/01/2010 (Yamagata 系統) を使用した。

5. 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。解析に用いたクレード、サブクレードの名称、代表株の選定等の分類は、WHO London Influenza Centre (MRC)⁹⁾または国立感染症研究所の報告¹⁰⁾に準拠した。また、ワクチン株、代表株等の HA 遺伝子の塩基配列は、GISAID

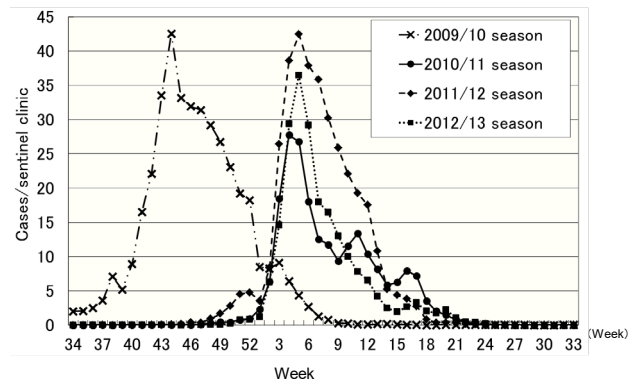


Fig. 1 Weekly cases of Influenza-like illness per sentinel clinic from 2009/10 season to 2012/13 season in Hyogo prefecture

(The Global Initiative on Sharing All Influenza Data) のデータベース (EpiFlu™) より引用した。なお、Fig4～7では、系統樹解析に引用した株名に続いて EpiFlu™ の Isolate ID を付記した。

III 結果と考察

1. 県内のインフルエンザの流行状況

2009/10 シーズンから 2012/13 シーズンまでの県内の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。

本シーズンの県内の流行は、2013 年第 1 週 (12 月 30 日～1 月 5 日) に流行の指標となる 1.0 人を超え、第 5 週 (1 月 28 日～2 月 3 日) に流行のピーク (36.5 人) に達した。定点あたり 30 人以上の流行警報レベルを超えたのは第 5 週のみで、その後、第 15, 16 週に僅かに増加した以外は、漸減傾向が続き第 21 週 (5 月 20 日～26 日) に終息した。流行期間は 21 週間であった。

本シーズンの定点あたりの累積患者数は 211 人で前シーズンの 353 人を下回り、過去 5 シーズンでは最も規模の小さい流行となった。

2. 県内のインフルエンザウイルスの検出状況

本シーズンのインフルエンザウイルスの検出状況を Fig.2 に示した。

当所に搬入された 217 検体のうち 203 検体 (93.5%) からインフルエンザウイルスが検出された。ウイルスの型および亜型別の検出数 (割合) は、多い順に A(H3N2) 型が 134 検体 (65%), B 型 Victoria 系統が 36 検体 (18%), B 型 Yamagata 系統が 29 検体 (14%), A(H1N1)pdm09 が 7 検体 (3%) であった。このうち 3 検体から A(H3N2) 型および B 型 Yamagata 系統ウイルスが重複して検出された。

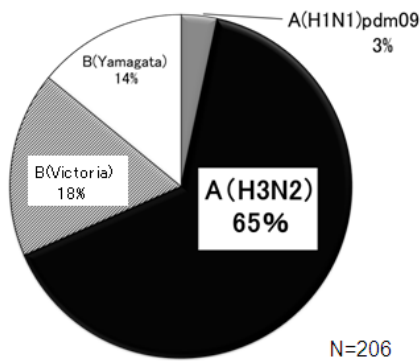


Fig. 2 Proportion of isolation/detection of influenza virus during 2012/13 season in Hyogo prefecture, Japan

本シーズンは、前シーズンと同様に A(H3N2)型が流行の主体となった。A(H1N1)pdm09 は前シーズンでは検出されなかったが、本シーズンは散発的に検出された。

一方、B 型の検出率は重複感染を含めた全検出数の 32%であり、前シーズン (37%) と同様であった。B 型 Victoria 系統と Yamagata 系統の検出割合は Victoria 系統が 55%を占め、前シーズンと同じく両系統による混合流行となった。

週別のインフルエンザウイルスの検出状況 (Fig.3) では、A(H3N2)型が 2012 年第 50 週 (12 月 10 日~16 日) から 2013 年第 20 週 (5 月 13 日~5 月 19 日) まで第 1 週、第 15 週および第 19 週を除き連続して検出された。初めて検出された第 50 週以降、検出数は漸増し、第 4 週 (1 月 21 日~27 日) でピークとなり、その後減少した。

一方、B 型は、第 2 週 (1 月 7 日~13 日) から第 24 週 (6 月 10 日~16 日) まで第 7 週および第 10 週を除い

て、連続して検出された。検出数に明瞭なピークは形成されず、シーズン後半にかけて増加傾向が見られた。また、週別の検出状況を見ると、B 型の両系統がシーズンを通してほぼ同じ比率で検出されたことから、シーズン当初から両系統が混在して流行していたと考えられた。

これらの結果から、本シーズンは A(H3N2)型がシーズンの前半からピーク時にかけて主流となっていたが、シーズン後半になると A 型および B 型の両系統の混合流行となっていたものと考えられた。

3. 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。

近年の A(H1N1)pdm09 ウイルス流行株は遺伝子系統樹解析では 8 つのクレードに分類され^{9,10}、前シーズンの北半球では、クレード 6 および 7 に属する株が主流であった¹¹。本シーズンの県内株を解析した結果、クレード 7 が 4 株、クレード 6 が 2 株であった。また、2013 年 7 月に中国での感染が推定された患者から分離された A/Hyogo/2002/2013 株はクレード 6 に分類された。

一方、国立感染症研究所による国内分離株の解析でも、すべてがクレード 6 および 7 のいずれかに属しており¹⁰、本シーズンは前シーズンの北半球流行株の類似株が、国内および県内でも流行したと考えられた。また、これらの流行株において HA タンパクの抗原領域 (Sa) の 153-157 番目のアミノ酸置換を特徴とする抗原変異株が報告^{10,12}されているが、県内分離株からはこれらの置換を有する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

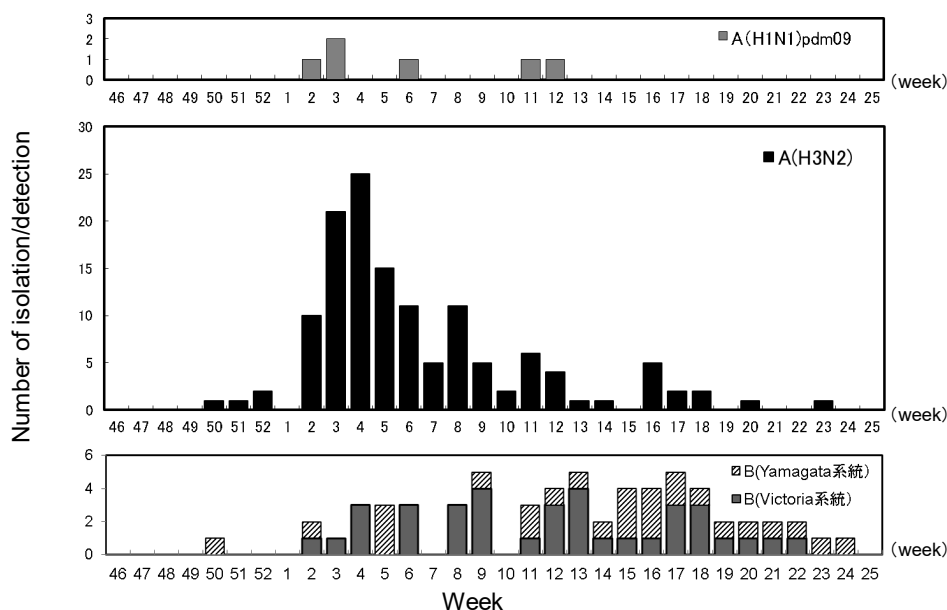


Fig. 3 Weekly isolation/detection of influenza virus during 2012/13 season in Hyogo prefecture, Japan

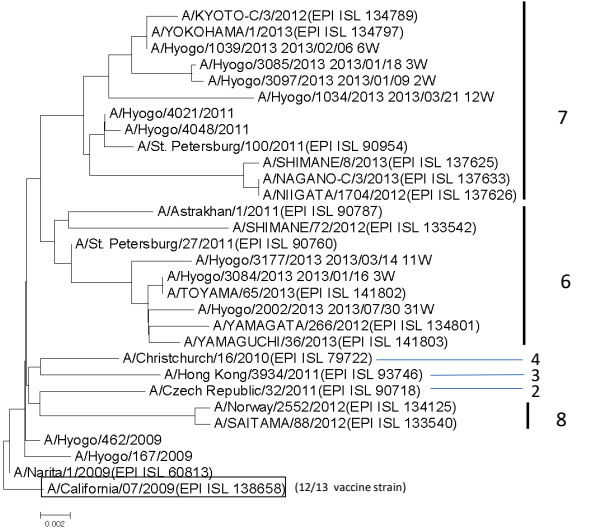


Fig. 4 Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1)pdm09 HA genes (HA1)

域)の遺伝子系統樹解析の結果を Fig. 5 に示した。

近年の A(H3N2)型ウイルス分離株は、T212A のアミノ酸置換を特徴とする Victoria/208 クレード内のクレード 3~7 に区分され、このうちクレード 3 はさらに 3A, 3B, 3C のクレードに細分される⁹⁾。前シーズンの北半球の流行では、クレード 3 および 6 に属する株が主流であった¹¹⁾。

県内で前シーズンに分離した株は、すべて Victoria/208 クレードのクレード 3 に属しており、すべての株は 3A, 3B, 3C のいずれかに分類された¹³⁾が、本シーズンは、解析した 50 株すべてがクレード 3C に属しており、その中でも N145S アミノ酸置換を持つサブクレードに属し、前シーズンと比べて流行株に均一性が認められた。本シーズンのワクチン株である A/Victoria/361/2011 株も同じくクレード 3C に属しており、県内株は遺伝学的にワクチン類似株であることが分かった。国立感染症研究所による国内分離株の調査でも、解析した株すべてがクレード 3C 内の N145S アミノ酸置換を有するサブクレードに属するワクチン類似株であったと報告¹⁰⁾されており、本シーズンのワクチン株の選定が適切であったと考えられた。

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。

近年の B 型 Victoria 系統分離株は B/Brisbane/60/2008 株に代表される Brisbane/60 クレードの L58P の置換を持つサブクレード 1A とそれ以外のサブクレード 1B に分類される⁹⁾。前シーズンの北半球の流行株は Brisbane/60 クレードの株が主流であった¹¹⁾。

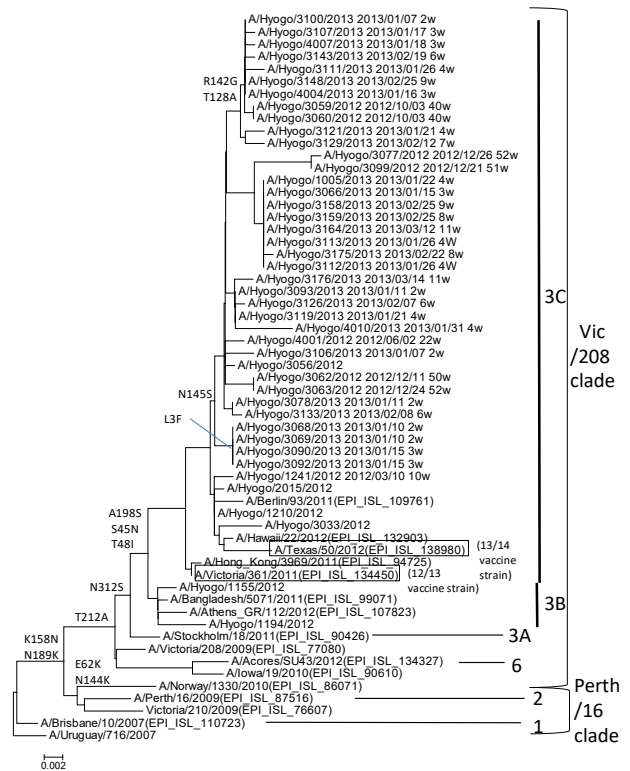


Fig. 5 Phylogenetic analysis of influenza A(H3N2) HA genes (HA1)

県内で分離された 2 シーズン前 (2011/12 シーズン) の株は、サブクレード 1A と 1B に入る株が混在し¹⁴⁾たが、前シーズンは、すべて Brisbane/60 クレードのサブクレード 1A に属していた¹³⁾。本シーズンの 14 株はすべて前シーズンと同じく Brisbane/60 クレードのサブクレード 1A に属しており、3 シーズンを通して変化は認められなかった。

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. 7 に示した。

B 型 Yamagata 系統の株は、B/Florida/4/2006 株を代表されるクレード 1 および P108A, S229G のアミノ酸置換を特徴とするクレード 2、ワクチン株の B/Wisconsin/01/2010 株が属し、S150I, N165Y, S229D のアミノ酸置換を持つクレード 3 に分類される¹²⁾。前シーズンの北半球の流行株は、クレード 2 およびクレード 3 が主流であった¹¹⁾。

県内の前シーズンの分離株は、クレード 2 およびクレード 3 であった¹³⁾が、本シーズンも、8 株中クレード 2 が 6 株、クレード 3 が 3 株で、すべて前シーズンと同様であった。今回多く分離されたクレード 2 の株は、クレード 3 の株と抗原性に差がなく¹⁰⁾、ワクチン類似株が県内でも流行したものと考えられた。

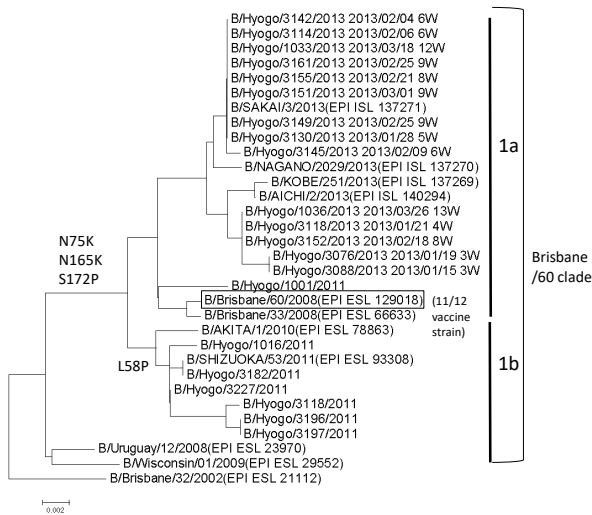


Fig. 6 Phylogenetic analysis of influenza B (Victoria-lineage) HA genes (HA1)

4. A型およびB型インフルエンザウイルスの重複感染症例

2013年1月26日(第4週)に医療機関で採取され、簡易検査でA型と判定された3検体についてウイルス分離を行った。その結果、初代培養4日後にCPEを認め、ウイルス液のHA価は64~128倍に達した。HI試験で、すべてがB型Yamagata系統と同定された。この結果は簡易検査と異なるため、ウイルス培養液を簡易キットで判定したところ、B型陽性かつA型に弱い反応を認めたことから、A型およびB型の重複感染を疑い追加試験を行った。

初代培養液をB/Wisconsin/01/2010株の抗血清で中和した上清をさらに2代継代培養したところ、A(H3N2)型ウイルスが分離された。分離されたA(H3N2)型ウイルス株のHI価は、A/Victoria/210/2009(H3N2)の抗血清(ホモ価1280倍)に対して640倍、A/California/07/2009(H1N1)pdm09、B/Brisbane/60/2008(Victoria系統)およびB/Wisconsin/01/2010(Yamagata系統)の抗血清に対してすべて10倍未満となり、本シーズンに分離されたA(H3N2)型株と同様のHI価を示した。

一方、初代培養液をA/Victoria/210/2009抗血清で中和して再分離したB型Yamagata系統のウイルス株のHI価は、B/Wisconsin/01/2010の抗血清(ホモ価2560倍)に対して1280倍、A/California/07/2009(H1N1)pdm09、A/Victoria/210/2009(H3N2)およびB/Brisbane/60/2008(Victoria系統)に対してはすべて10倍未満となり、本シーズンに分離されたB型Yamagata系統株と同様のHI価を示した。

検査の過程でのコンタミネーションの可能性を排除す

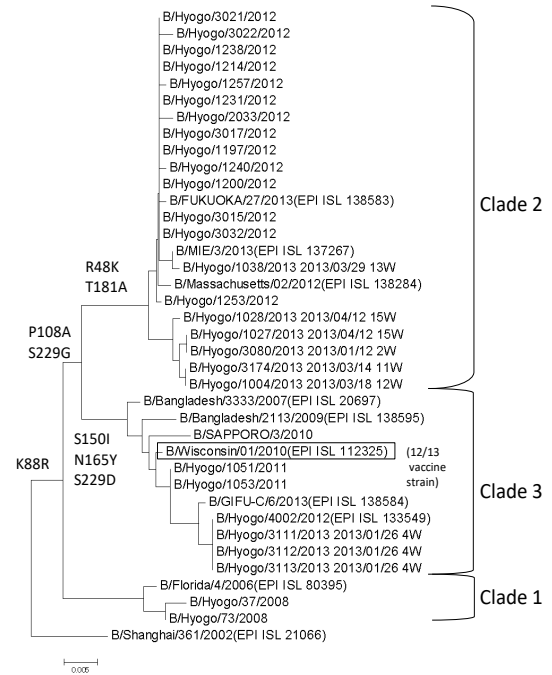


Fig. 7 Phylogenetic analysis of influenza B (Yamagata-lineage) HA genes (HA1)

るため、検体から直接Real-Time RT-PCRを行ったところ、A(H3N2)型およびB型ウイルス遺伝子の両方が検出された。A(H3N2)型ウイルス遺伝子のCt(Threshold Cycle)値は15~26で、B型は34~36であったことから、検体に含まれるウイルス遺伝子の量はA(H3N2)型ウイルス遺伝子の方が多いたことが判明した。これは、簡易検査の結果を裏付ける結果であるが、MDCK細胞によるウイルス分離では、優勢なA型ウイルスが分離されにくかったことを示している。データは示していないが、近年の当所におけるMDCK細胞を用いたウイルス分離では、A型よりもB型ウイルスの方がCPEの出現が早く、得られるHA価も高い傾向が認められている。今回のウイルス分離法による検査でB型が先に同定されたのは、MDCK細胞におけるそれぞれのウイルスの増殖効率の違いによるものと考えられた。これらの現象は、今後の検査において注意する必要があると考えられた。

検出されたウイルスのHA遺伝子のHA1領域の塩基配列を比較した結果、B型ウイルス遺伝子は3株すべてクレード3に属し、塩基配列も一致したが、A(H3N2)型ウイルス遺伝子はすべてクレード3Cに属し、塩基配列は1株が一致しなかった。このことからA型、B型ウイルス株の塩基配列が共に一致した2人の患者は、同一の感染源による感染の可能性が考えられたが、これらの患者間に疫学的関連性がないため感染源は不明であった。また、3名の患者は受診時に発熱や上気道炎等の通常のインフルエンザの症状を呈しており、肺炎等の重い症状

は認められなかった。

このような同一患者からの異なるインフルエンザウイルスの同時検出例は稀なケースであり^{15),16),17)}, 今回の同一医療機関で同一日に受診した複数の患者から異なるインフルエンザウイルス株が分離された症例は極めて少ない。近年は複数のインフルエンザウイルスが混合流行するシーズンが多いが, このような状況下では異なるウイルスが同時感染する症例が低頻度ながら起こっていることが考えられ, 交雑による新型ウイルスや薬剤耐性ウイルスの出現が誘発される一現象と思われる。重複感染例では通常の感染よりも重症化することも考えられるため, これらの発生動向や発生時の臨床像について注視する必要がある。

IV 要 旨

兵庫県における 2012/13 シーズンのインフルエンザの流行は, 過去 5 シーズンで最も規模の小さい流行となった。A(H3N2)型が主流となり, 続いて B 型 (Victoria 系統, Yamagata 系統) が検出され, A(H1N1)pdm09 ウイルスが最も少なかった。

A(H3N2)型ウイルス株の HA 遺伝子の系統樹解析では, 解析したすべての株がワクチン株と同じ Victoria/208 クレードのクレード 3C に属し, N145S のアミノ酸置換を伴っていた。B 型 Victoria 系統分離株の HA 遺伝子の系統樹解析では, 解析株のすべてがワクチン株と同じ Brisbane/60 クレードに属し, サブクレード 1A に属した。B 型 Yamagata 系統の分離株の HA 遺伝子の系統樹解析では, クレード 2 およびワクチン株である B/Wisconsin/01/2010 株と同じクレード 3 に属していた。今回の調査で同一の医療機関で同一日に患者から採取された 3 検体から, A(H3N2)型ウイルスと B 型 Yamagata 系統ウイルスが同時に分離・検出された。今回のケースから, 本シーズンのように複数のタイプのウイルスが混合流行するシーズンでは, 低頻度ながらこのような重複感染が起こることが考えられた。

文 献

- 1) WHO : Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus :http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/WHO_H7N9_review_31May13.pdf?ua=1
- 2) WHO : Influenza and the human-animal Interface Summary and assessment as of

Summary and assessment as of 25 February 2014
http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_25February14.pdf?ua=1

- 3) Swine-origin influenza A (H3N2) virus infection in two children—Indiana and Pennsylvania, July–August 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, **60**, 1213–5 (2011)
- 4) Limited human-to-human transmission of novel influenza A (H3N2) virus—Iowa, November 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, **60**, 1615–7 (2011)
- 5) Bowman, A. S., Sreevatsan, S., Killian, M. L., Page, S. W., Nelson, S. W., Nolting, J. M., Cardona, C., Slemons, R. D.: Molecular evidence for interspecies transmission of H3N2pM/H3N2v influenza A viruses at an Ohio agricultural fair, July 2012, *Emerging Microbes & Infections* **1**, e33, (2012)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) WHO influenza centre London : Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere interim-report-feb-2012 : <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2012.pdf>
- 10) IASR 病原微生物検出情報 (月報), **34**, 第 11 号, 325-334 (2013)
- 11) WHO : Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012-2013 northern hemisphere influenza season : http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201202_recommendation.pdf?ua=1
- 12) IASR 病原微生物検出情報 (月報), **33**, 第 11 号, 285-294 (2012)

- 13) 押部智宏, 齋藤悦子, 榎本美貴, 高井伝仕, 近平雅嗣, 岡藤輝夫, 飯尾潤, 吉田昌史: 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, 飯尾潤, 近平雅嗣: 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)
- 15) IASR 病原微生物検出情報 (月報), **31**, 第 2 号, 54-56 (2010)
- 16) IASR 病原微生物検出情報 (月報), **26**, 第 11 号, 297-298 (2005)
- 17) 高尾信一, 原三千丸, 角田修, 島津幸枝, 桑山勝, 福田伸治, 宮崎佳都夫: 迅速診断キットで A 型と B 型インフルエンザウイルスの重複感染が疑われ, RT-PCR 法とウイルス分離法で確定された 11 例について. 日本感染症学雑誌, **79**, 第 11 号, 877-886 (2005)

[平成 26 年 4 月 1 日受理]