

[ノート]

兵庫県における 2015/16 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* 荻 美貴 高井 伝仕 近平 雅嗣 望月 利洋

Characteristic Analysis of the Seasonal Influenza Viruses in Hyogo Prefecture, Japan, during the 2015/16 Season

Tomohiro OSHIBE*, Miki OGI, Denshi TAKAI, Masatsugu CHIKAHIRA
and Toshihiro MOCHIZUKI*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*

In Hyogo prefecture, Japan, influenza activity during the 2015/16 influenza season was the second largest in the past 5 seasons. Influenza A(H1N1)pdm09 and B (Yamagata lineages) viruses predominated, followed by influenza B (Victoria lineages) and A(H3N2) viruses.

The HA genes of A(H1N1)pdm09 viruses fell into the genetic subgroups 6B.1 (76%) and 6B.2 (24%). The HA genes of A(H3N2) viruses fell into the phylogenetic clade 3C.2a1. The HA gene sequences of B (Victoria lineage) viruses belonged to genetic group 1A, the B/Brisbane/60/2008 genetic group. The HA genes of B (Yamagata lineage) viruses fell within the genetic clade 3 including B/Phuket/3073/2013 (2015/16 season vaccine strain).

I はじめに

インフルエンザウイルスはこれまで A~C 型の 3 つの型に分類されたが、2011 年に呼吸器疾患の豚から C 型様のウイルスが分離され¹⁾、これが D 型として新たに加わる見込みとなっている。このうち毎年冬季に流行し、ヒトに急性の発熱や上気道炎等を引き起こす季節性のインフルエンザウイルスは A 型及び B 型で、抗原性の違いにより、A 型は 2009 年にパンデミックを引き起こした A(H1N1)pdm09 と A 香港型 (以下 A(H3N2)型)、B 型は 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毎年流行を繰り返しており、次季のワクチン株を選定するには、流行するウイルスのタイプや性状変化を把握することが重要である。

当所では、感染症発生動向調査事業の一環としてインフルエンザウイルスのサーベイランスを実施しており、県内のインフルエンザ様疾患患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 2015/16 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

2015/16 シーズン (2015 年第 36 週 (8 月 31 日~9 月 6 日) から 2016 年第 35 週 (8 月 29 日~9 月 4 日)) に県内の指定提出機関 (21 か所) で採取された 221 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

感染症部

*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

取した 12 検体の合計 233 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²⁾。

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³⁾、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^{4),5)}。

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^{4),5)}。標準抗血清は国立感染症研究所より分与された免疫ウサギ抗血清 A/California/07/2009 (H1N1)pdm09, A/Switzerland /9715293/2012 (H3N2), B/Texas/2/2013 (Victoria 系統) 及び免疫フェレット抗血清 B/Phuket/3073/2013 (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²⁾。

6. インフルエンザウイルスの遺伝子解析

RT-PCR 法で増幅した HA 遺伝子の HA1 領域を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、The Crick Worldwide Influenza Centre (WIC) または国立感染症研究所の報告に基づいた^{6),7)}。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 (EpiFlu™) を使用し、Fig.4~7 では、引用した株名の横に EpiFlu™ の Isolate ID を示した。

III 結果及び考察

1. 県内のインフルエンザの流行状況

2012/13シーズンから本シーズンまでの感染症発生动

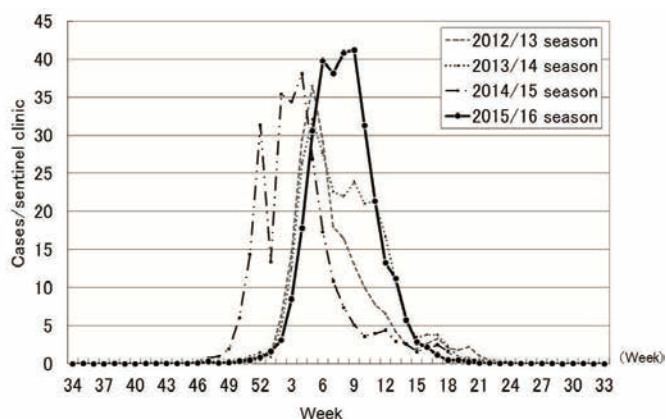


Fig.1 Weekly cases of Influenza-like illness per sentinel clinic from 2012/13 season to 2015/16 season in Hyogo prefecture, Japan.

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、全国の調査と同じく 2016 年第 1 週 (1 月 4 日~10 日) に流行開始の指標となる 1.0 人を超え⁷⁾、2014/15 シーズンよりも 4 週遅い流行入りとなった⁸⁾。その後急速に増加し全国よりも 1 週早い 2016 年第 5 週 (2 月 1 日~7 日) に警報水準とされる定点あたり 30 人を超えた⁷⁾。第 6 週 (2 月 8 日~14 日) には 39.8 人となりピークを迎え、第 7 週 (2 月 15 日~21 日) は 38.1 人と一旦減少した後、第 8 週 (2 月 22 日~28 日) に再び増加に転じて第 9 週 (2 月 29 日~3 月 6 日) に 41.2 人と本シーズンの最高値となった。その後、急速に減少して第 11 週 (3 月 14 日~20 日) は 21.3 人と警報水準を下回った。警報水準の持続期間は第 5 週から第 10 週までの 6 週間であり過去 5 シーズンで最長であった。

その後は徐々に減少して第 17 週 (4 月 25 日~5 月 1 日) まで患者数 1.0 人以上が持続した。本シーズンの流行期間は 17 週間で、過去 5 シーズンの中で最短であった。この期間の定点あたり累積患者数は 311 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, 3 に示した。

検査した 233 検体のうち 229 件 (98 %) からインフルエンザウイルスが検出された。内訳は、A 型が 108 件 (47%)、B 型が 121 件 (53%) で、B 型が多く検出された。全国的には A 型が 56%、B 型が 44% で A 型が多く検出され、県内の結果と異なっていた⁷⁾。

検出された亜型 (系統) は、A(H1N1)pdm09 が 79 件

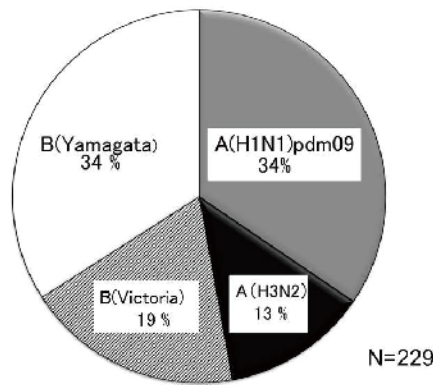


Fig.2 Proportion of isolation/detection of influenza virus during 2015/16 season in Hyogo prefecture, Japan

(34%), B型 (Yamagata 系統) が 78 件 (34%) , B 型 (Victoria 系統) が 43 件 (19%) , A(H3N2)型が 29 件 (13%) であり, 例年より B 型 (Yamagata 系統) の検出割合が高かった。

各亜型の出現状況を過去のデータと比較すると, A 型では 2012/13 シーズンは A(H3N2)型⁹⁾, 2013/14 シーズンは A(H1N1)pdm09¹⁰⁾, 2014/15 シーズンは A(H3N2)型が主体となっていた⁸⁾. 本シーズンは A(H1N1)pdm09 の 2 シーズンぶりの流行となった。

一方, B 型の Yamagata 系統と Victoria 系統を比較すると, 2012/13 シーズンは Victoria 系統が 55%を占め⁹⁾, 2013/14 シーズンは Yamagata 系統が 67%¹⁰⁾, 2014/15 シーズンは Yamagata 系統が 91%を占めた⁸⁾. 本シーズンは Yamagata 系統が 64%と 3 シーズン連続して

Yamagata 系統が多い結果となった. 一方, 全国の調査は Yamagata 系統が 56%であり⁷⁾, 県内の検出割合の方が高く, 本県の B 型の流行パターンは全国と異なる傾向が確認された。

3. 週別のインフルエンザウイルスの分離・検出状況

本シーズンの調査が開始された第 36 週から流行開始の第 1 週までの検出状況では, 第 46 週 (11 月 9 日~15 日) に本シーズン初めて A(H3N2)型が検出され, その後も散発的に検出され A(H3N2)型が計 6 件となった. B 型は第 52 週に Victoria 系統が 2 件検出された。

流行開始の第 1 週から警報水準に達するまでの第 4 週は, A 型が 37 件, B 型が 10 件の計 47 件が検出され, 内訳は A(H1N1)pdm09 が 32 件, B 型 (Yamagata 系統) が 7 件, A(H3N2)型が 5 件, B 型 (Victoria 系統) が 3 件と, 4 種類のウイルスが検出された。

その後の第 5 週から第 10 週まで警報水準が持続したピーク期には, A 型が 51 件, B 型が 64 件と B 型の検出数が逆転した. この内訳は B 型 (Yamagata 系統) が 41 件, A(H1N1)pdm09 が 39 件, B 型 (Victoria 系統) が 23 件, A(H3N2)型が 12 件で, 流行初期と同様に 4 種類のウイルスが検出された。

第 11 週から第 17 週までの流行後期には, A 型が 9 件, B 型が 40 件の 49 件が検出された. 内訳は B 型 (Yamagata 系統) が 28 件, B 型 (Victoria 系統) が 12 件, A(H1N1)pdm09 が 6 件, A(H3N2)型が 3 件で, この時期にも 4 種類のウイルスが検出された。

流行が終息した第 18 週 (5 月 2 日~8 日) から調査終

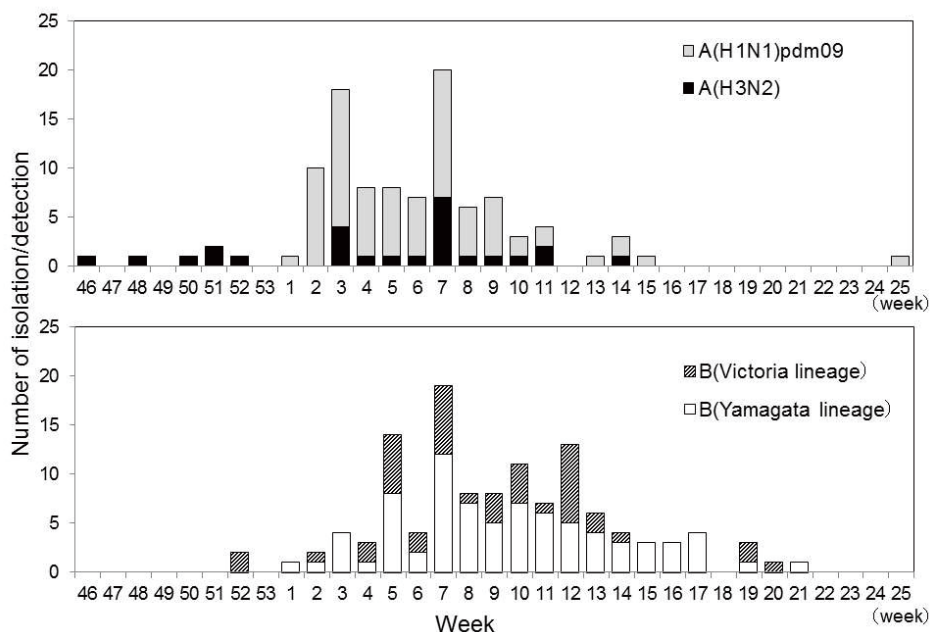


Fig.3 Weekly isolation/detection of influenza virus during 2015/16 season in Hyogo prefecture, Japan

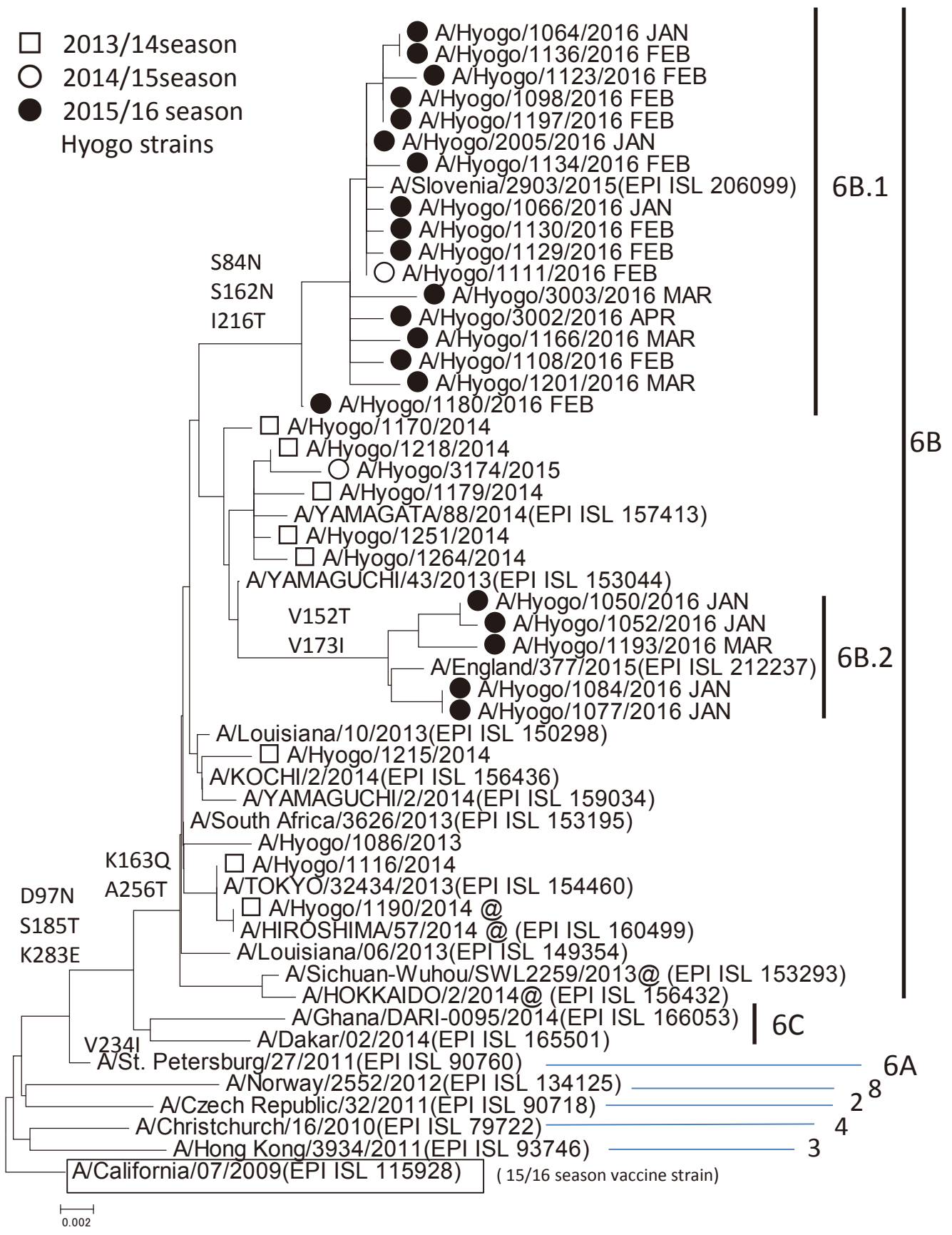


Fig.4 Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1)pdm09 HA genes (HA1)

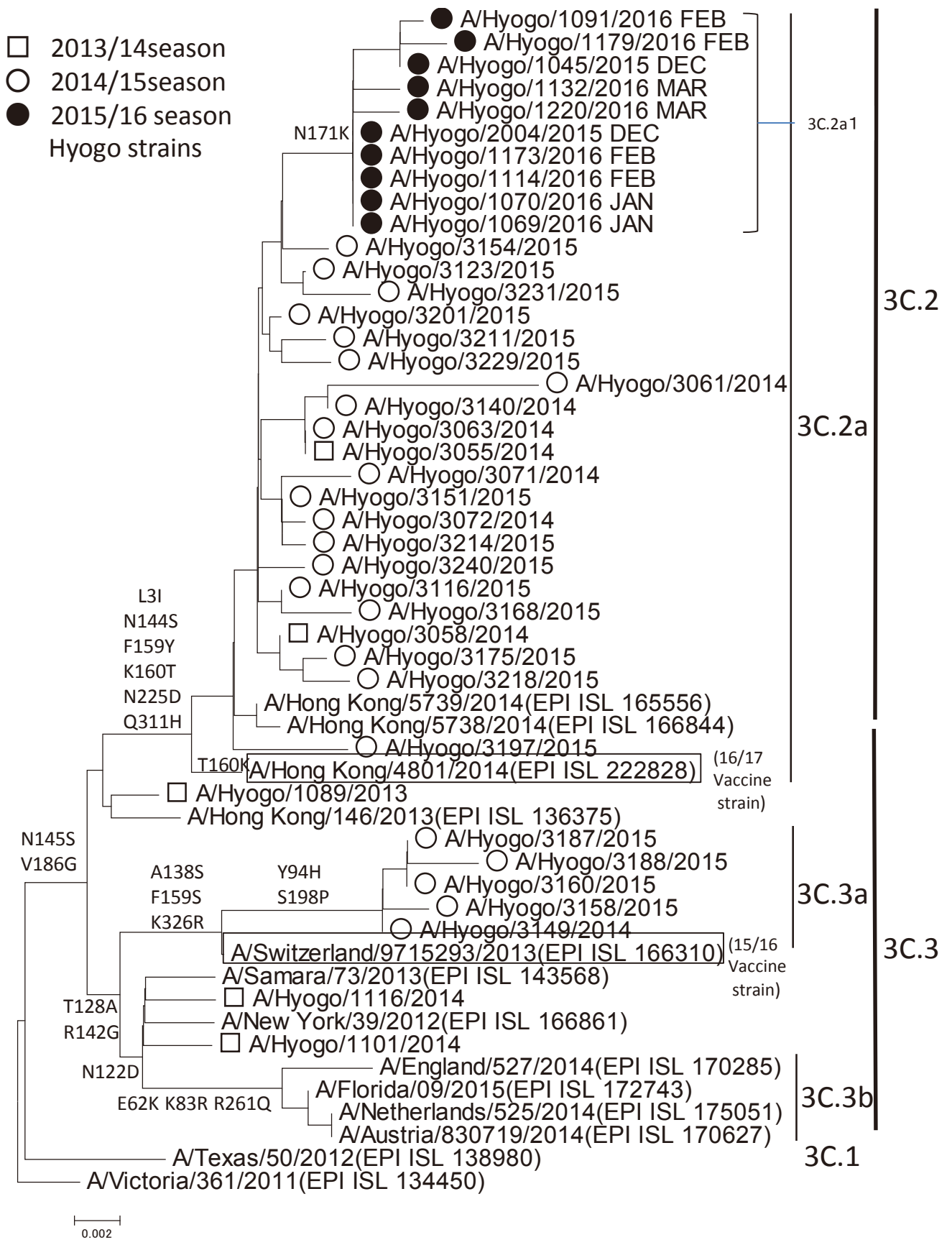


Fig.5 Phylogenetic analysis of influenza A(H3N2) HA genes (HA1)

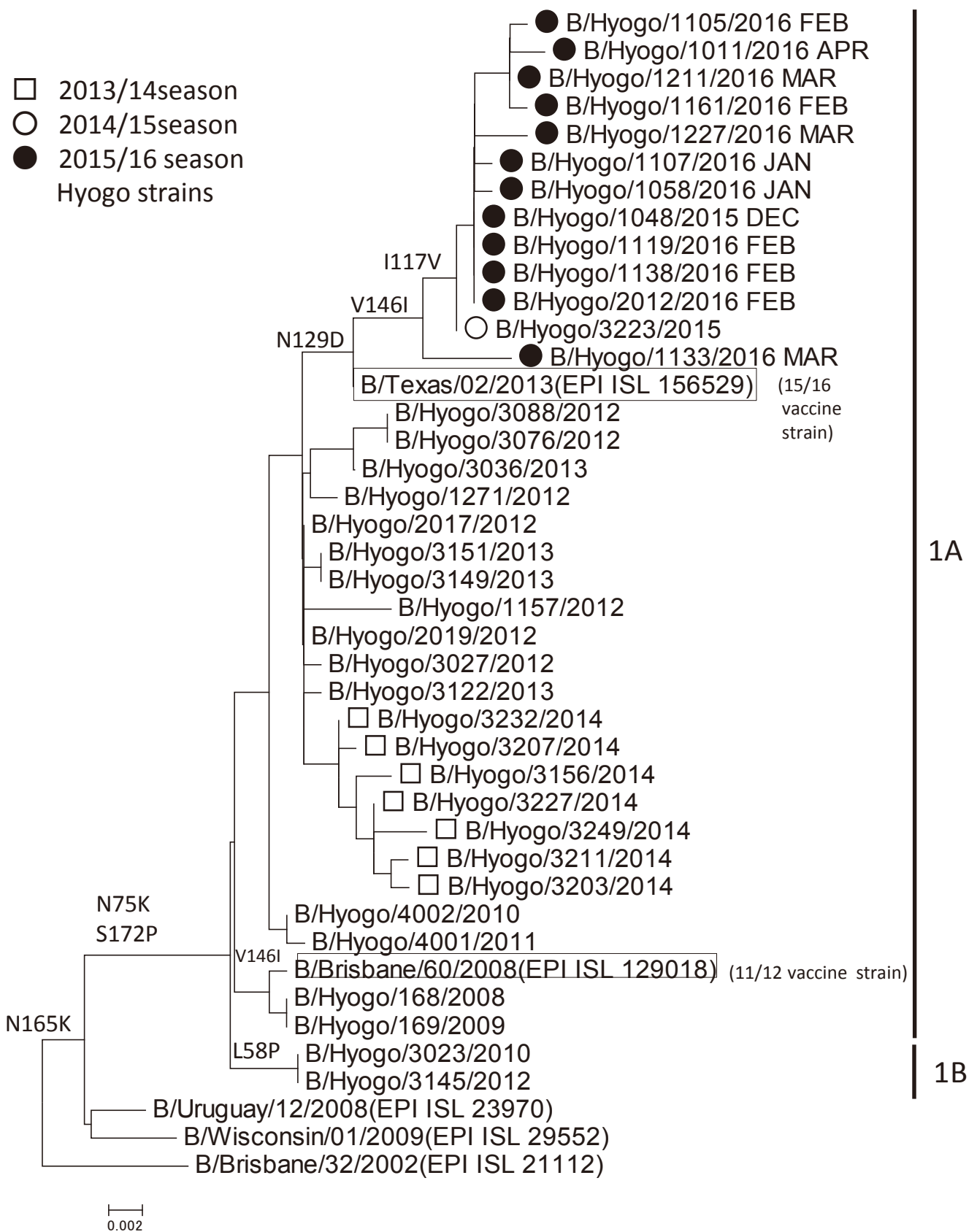


Fig.6 Phylogenetic analysis of influenza B (Victoria-lineage) HA genes (HA1)

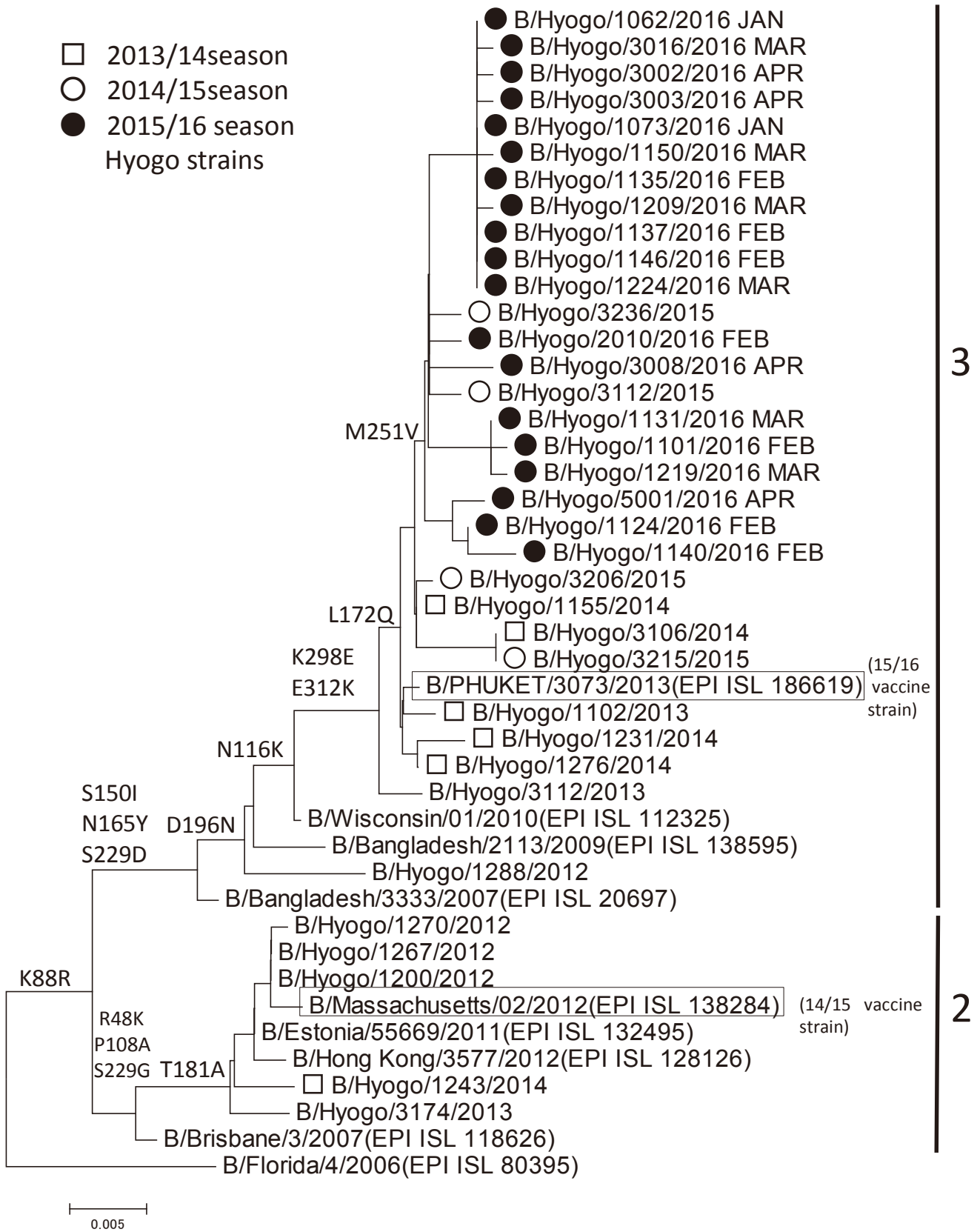


Fig.7 Phylogenetic analysis of influenza B (Yamagata-lineage) HA genes (HA1)

了の第35週までは、B型（Victoria系統）が3件、A(H1N1)pdm09とB型（Yamagata系統）がそれぞれ1件検出された。

過去の流行では、A型が先行してピークを形成し、その後B型が遅れて増加するパターンが多いが、本シーズンのピーク期はB型がA型よりも多く検出されていることから、B型の流行が例年よりも早く、その後も流行が持続して、A型の流行と重なったため流行ピークが長期化したものと思われる。

また、流行の主体となったA(H1N1)pdm09とB型（Yamagata系統）以外にもB型（Victoria系統）やA(H3N2)型も全流行期間を通じて全体の20%及び10%程度がそれぞれ検出されており、これらの4種類のウイルスが混合流行したことも本シーズンの流行の特徴であった。

4. 抗インフルエンザ薬耐性株の検出

Real-Time RT-PCR法によりA(H1N1)pdm09ウイルス株53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。全国の調査では、国内分離A(H1N1)pdm09の2565株のうち48株（1.9%）のオセルタミビル・ペラミビル耐性株が散発的に検出されており⁷、今後も検出動向を注視する必要がある。

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に区別され、クレード6はさらにサブクレード6A、6B、6Cに分類される¹⁰。2013/14及び2014/15シーズンの県内解析株は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^{8,10}。本シーズンの分離株は、6Bクレード内にS84N、S162N、I216Tを持つクレード6B.1とV152T、V173Iを持つクレード6B.2に分類され^{8,7}、解析した県内株は、21株のうち16株（76%）がクレード6B.1に、残りの5株がクレード6B.2に属していた。国立感染症研究所による国内分離株の解析でも80.1%がクレード6B.1となっており⁷、県内分離株と同様の結果であった。

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が主流で⁹、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のサブクレードへと派生した¹⁰。3C.2はL3I、N144S、F159Y、

K160T、N255D、Q311Hのアミノ酸置換を有する3C.2aサブグループに分岐した。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サブグループが追加されている^{8,10}。本シーズンは、さらにサブグループ3C.2a内にN171K、I406V、G484Eを持つ3C.2a1サブクレードが新たに形成されており^{8,7}、今回我々が解析した10株はすべてサブグループ3C.2aのサブクレード3C.2a1であった。全国の結果でも98.4%がサブグループ3C.2aに属し、サブクレード3C.2a1に分類される傾向がみられており⁷、県内の結果と同様であった。

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¹²。2013/14シーズンの県内の分離株は、すべてサブクレード1Aに属し¹⁰、2014/15シーズンの分離株はV146Iを持つサブクレード1Aであった⁸。本シーズンに解析した12株もすべて2014/15シーズンと同様にV146Iを持つサブクレード1Aに属した。

全国的にも、本シーズンの分離株はすべてサブクレード1Aに属しており⁷、県内と同様の結果であった。

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に区別される¹²。県内の2013/14シーズンの分離株は、前のシーズンと同様にクレード2と3が混在し、クレード3が優勢であった¹⁰。2014/15シーズンは、クレード2と3は混在することなく、すべてクレード3であった⁸。

本シーズンの分離株で解析した19株はすべてM251Vを持つクレード3に属し、前シーズンと同じくクレード2に属する株はみられなかった。全国の解析でも、本シーズンはすべてクレード3に属しており⁷、県内と同様の結果であった。

IV 結 論

兵庫県における2015/16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(H1N1)pdm09及びB型（Yamagata系統）ウイルスが検出され、A(H3N2)型とB型（Victoria系統）も検出された。

遺伝子系統樹解析の結果、A(H1N1)pdm09ウイルスは、

系統樹解析からクレード6B.1 (76%) 及び6B.2 (24%) に属し, A(H3N2)型ウイルスはすべて3C.2a1 クレードに属した. B型 (Victoria 系統) はサブクレード1Aに属し, B型 (Yamagata 系統) の分離株は, すべてクレード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) Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003176 (2013)
- 2) 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)
- 3) 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研究センター紀要, **4**, 54-57 (2007)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) WHO influenza centre The Francis Crick Institute London: Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2017 26th-28th September 2016: https://www.crick.ac.uk/media/326439/september_2016_interim_report.pdf
- 7) 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), **37**, 211-221 (2016)
- 8) 押部智宏, 荻美貴, 高井伝仕, 岡藤輝夫ほか: 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, **7**, 1-9 (2016)
- 9) 押部智宏, 荻美貴, 高井伝仕, 岡藤輝夫ほか: 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, **6**, 1-11 (2015)
- 10) 押部智宏, 荻美貴, 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)
- 11) 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), **36**, 199-207 (2015)
- 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**, 254-258 (2014)

(平成29年3月13日受理)