

原著

福岡県における2014/15シーズンのインフルエンザウイルス検出状況

芦塚由紀・吉富秀亮・中村麻子・濱崎光宏・堀川和美・世良暢之

福岡県における2014/15シーズンのインフルエンザの流行は、2012/13シーズンから2シーズンぶりにA/H3亜型が主流であった。流行開始時期は平年より2週間程度早い立ち上がりで、県内においては第48週頃からインフルエンザウイルスが検出され、2015年の第2～4週頃がピークであった。県内で分離されたA/H3亜型について系統樹解析を行った結果、2014/15シーズンに分離された株は2つのサブクレード（サブクレード3C.3a及びサブクレード3C.2a）に分類された。

[キーワード：2014/15シーズン、インフルエンザ、分離、遺伝子解析、系統樹解析]

1 はじめに

インフルエンザは、オルトミクソウイルス科に属するインフルエンザウイルスによるウイルス性呼吸器感染症で、毎年、冬期に流行を繰り返している。インフルエンザウイルスは、抗原性の違いによりA、B、C型の3つの属に分類され、さらにA型は表面構造の違いにより多数の亜型に分類される。近年主に流行しているのはA/H1pdm09亜型及びA/H3亜型の2つの亜型である。B型及びC型には亜型はないが、B型は抗原性の異なる山形系統とビクトリア系統の2系統に細分類される。

近年の日本国内における主流株は、A型は2009/10がA/H1pdm09型、2010/11がA/H1pdm09型とA/H3亜型の同時流行、2011/12および2012/13シーズンはA/H3亜型と変化している。2013/14シーズンは、A/H1pdm09亜型及びB型山形系統を主流株とし、A/H3亜型及びB型ビクトリア系統を含めた4種のインフルエンザウイルスによるものであった¹⁾。福岡県においても、毎年、感染症発生動向調査事業におけるインフルエンザウイルスの亜型別の検出状況等を報告しており、同様の傾向である²⁾³⁾⁴⁾。

同一の亜型内でも、ウイルス遺伝子に起こる変異の蓄積によって、抗原性は少しずつ変化する。インフルエンザウイルスでは連続抗原変異が頻繁に起こるので、毎年のように流行を繰り返す。そのため、型・亜型の検査だけではなく、シーズン毎に流行株の遺伝子解析及び抗原性解析を行い、遺伝子レベルでの流行株の変遷や抗原性の変化等を把握することが必要である。

本稿では、2014/15シーズンの感染症発生動向調査及びインフルエンザ集団発生事例における検査結果から流行状況を考察し、さらに2014/15シーズンを含めた過去3シー

ズンにおける県内分離株の系統樹解析を行ったので報告する。

2 方法

2・1 検体および患者情報

2014年第36週から2015年第22週に感染症発生動向調査において、福岡市と北九州市を除く県内の病原体定点でインフルエンザと診断され、当所に搬入された咽頭ぬぐい液215件、糞便1件、気管吸引液1件、その他1件の合計218件を検査した。

また、インフルエンザ集団発生事例の検査として、福岡県「インフルエンザ様疾患発生報告」実施要領に基づき、県内の4ブロック（福岡、筑後、筑豊、北九州）でのインフルエンザ様疾患の初発施設（幼稚園および小学校）における患者23名から採取された検体（咽頭ぬぐい液とうがい液を重複して採取したものを含む計34検体）を検査した。

患者の臨床症状および抗インフルエンザ薬の使用状況は、感染症発生動向調査事業による感染症発生動向調査検査票もしくはインフルエンザ集団発生事例の調査票に基づき集計した。

2・2 型・亜型の検査方法及び抗原性解析

検査法は、国立感染症研究所が示すインフルエンザ診断マニュアル⁵⁾に準拠し、型・亜型の同定はリアルタイムRT-PCR法により行い、ウイルスの分離はMDCK細胞を使用して行った。

MDCK細胞によりウイルスが分離された検体については、赤血球凝集(HA)試験を実施した。HAが8倍以上であった場

合はワクチン株に対する抗血清を用いた赤血球凝集阻止（HI）試験により抗原性解析を行った。

2・3 インフルエンザウイルスの系統樹解析

2012/13シーズンから2014/15シーズンの過去3シーズンに、福岡県内で採取された検体から分離されたインフルエンザウイルスのHemagglutinin（HA）遺伝子の塩基配列について系統樹解析を行った。

HA遺伝子の塩基配列の決定は、インフルエンザ診断マニュアル⁶⁾に準拠し、A/H3亜型の1024bpの塩基配列を決定した。系統樹作成は、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に協力依頼し、参照株（国内流行株及びワクチン株）と共に近隣結合（Neighbor-joining, NJ）法により解析された。解析ソフトウェアは塩基配列解析ソフトウェアMolecular Evolutionary Genetics Analysisを用い、検定はブートストラップ法（1000回サンプリング）により行った。

3 結果及び考察

3・1 インフルエンザ患者の情報

感染症発生動向調査で検体が採取された患者の内訳は男性 96 名、女性 122 名の計 218 名で、年齢は 0～93 歳で、平均年齢は 35.4 歳であった。年齢区分別の内訳は、0～9 歳が 43 名、10～19 歳が 29 名、20～29 歳が 22 名、30～39 歳が 25 名、40～49 歳が 32 名、50～59 歳が 24 名、60～69 歳が 17 名、70～79 歳が 14 名、80～89 歳が 10 名、89～99 歳が 2 名であった。臨床症状は、発熱が 201 名（92.2%）、頭痛が 82 名（37.6%）、関節痛が 57 名（26.1%）、上気道炎が 89 名（40.8%）、筋肉痛が 31 名（14.2%）、下気道炎が 11 名（5.0%）、及び胃腸炎が 20 名（9.2%）であった。前シーズンと比較すると、上気道炎（前シーズンは 24%）、

胃腸炎（前シーズンは 2%）の割合が高かった⁴⁾。抗インフルエンザ薬の服薬状況では、調査票に記載があった 171 件を集計した結果、イナビルが 112 件（65.5%）、タミフルが 41 件（24%）、ラピアクタが 10 件（5.8%）、リレンザは 9 件（5.3%）で、前シーズンと同様に、イナビルの使用率が最も高かった⁴⁾。

インフルエンザ集団発生事例の検査で、検体が採取された患者は幼稚園児及び小学生 23 名で、内訳は男児 18 名、女児 5 名、年齢は 5～11 歳であった。臨床症状は、発熱が 22 名（95.7%）、頭痛が 17 名（73.9%）、胃腸炎が 12 名（52.2%）、上気道炎が 9 名（39.1%）、関節痛及び筋肉痛が 7 名（30.4%）であった。抗インフルエンザ薬の服薬状況では、タミフルが 8 件（34.8%）、リレンザは 4 件（17.4%）、イナビルが 4 件（17.4%）、ラピアクタが 2 件（8.7%）、服用無しが 5 名（21.7%）であった。5～7 歳の小児にはタミフルが、10～11 歳の小児にはリレンザ、イナビル、ラピアクタが使用されていた。

3・2 インフルエンザウイルスの遺伝子型・亜型の検査及び抗原性解析の結果

感染症発生動向調査で搬入された 218 件の遺伝子検査結果は 187 検体がインフルエンザ陽性で、A/H3 亜型が 161 件（陽性の 86.1%）、B 型山形系統が 15 件（8.0%）、A/H1pdm09 亜型が 10 件（5.3%）、B 型系統不明が 1 件（0.5%）、陰性が 30 件であった。

図 1 に 2014/15 シーズンの福岡県におけるインフルエンザウイルスの週別検出数を示した。2014 年は流行開始時期が全国的に平年より 2 週間程度早い立ち上がりであったが、県内においても第 48 週頃からインフルエンザウイルスが検出され、2015 年の第 2～4 週目がピークであった。型別では全国的に A/H3 亜型が主流であり⁶⁾、県内におい

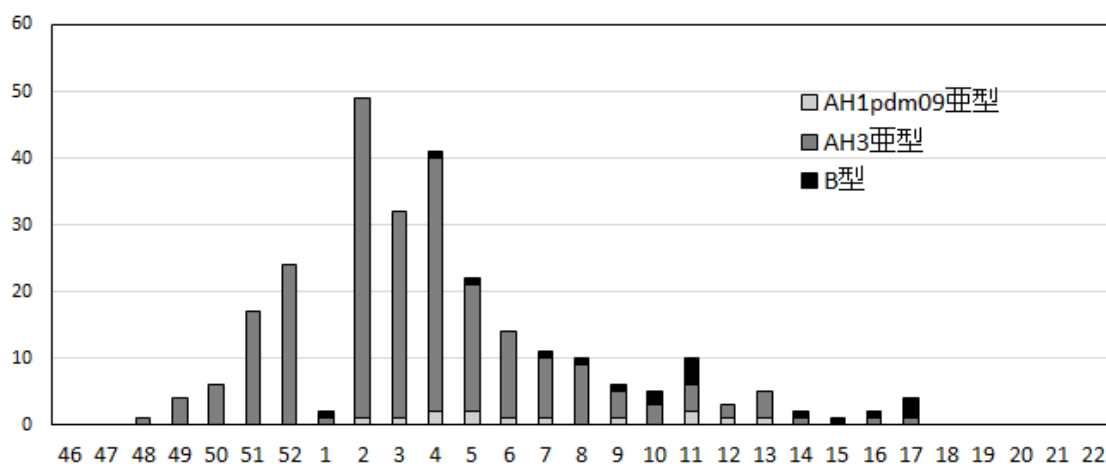


図 1 インフルエンザウイルスの週別検出状況

表1 インフルエンザ集団発生例における検出状況

ブロック名	施設	検体の種類	検体採取日	検体数	リアルタイム PCR 陽性数	ウイルス 分離数	検出された 亜型
福岡	筑紫保健所管内 A 小学校	うがい液	12 月 2 日	4	4	1	A/H3 亜型
北九州	宗像・遠賀保健所管内 B 幼稚園	うがい液	12 月 9 日	4	3	0	A/H3 亜型
		咽頭ぬぐい液	12 月 9 日	5	1	0	A/H3 亜型
筑後	北筑後保健所管内 C 小学校	うがい液	12 月 11 日	7	6	2	A/H3 亜型
		咽頭ぬぐい液	12 月 11 日	6	5	0	A/H3 亜型
筑豊	嘉穂・鞍手保健所管内 D 小学校	うがい液	12 月 19 日	8	8	3	A/H3 亜型

表2 インフルエンザウイルス分離株の赤血球凝集阻止 (HI) 試験の結果

抗原		抗血清
		A/New York/39/2012 に対する HI 価
標準株	A/New York/39/2012	5120 (ホモ価)
	分離株 1	640*
	分離株 2	640*
	分離株 3	1260

* 標準株から 8 倍以上反応性の低下した株を抗原変異株とみなす。

でも同様であった。

インフルエンザ集団発生事例における遺伝子検査の結果を表1に示した。初発事例は福岡ブロックでは第49週に発生しており、北九州及び筑後ブロックが第50週、筑豊ブロックが第51週とつづき、感染症発生動向調査でインフルエンザウイルスが検出され始めた頃に、各ブロック内での施設における初発の集団発生が起きていた。いずれの施設においても、検出された亜型はすべて流行の主流のA/H3亜型であった。1名は陰性であったが(咽頭ぬぐい液及びうがい液いずれも陰性)23名中22名の患者からA/H3亜型が検出されており、リアルタイムPCRの検出率は、うがい液が23件中21件(91.3%)、咽頭ぬぐい液が11件中6件(54.5%)とうがい液の方が高かった。MDCK細胞を用いたウイルス分離についても、分離された検体はすべてうがい液であった。

MDCK細胞により分離され、HAが8倍以上であった3株について、HI試験により抗原性解析を実施した。A/H3亜型のワクチン株であるA/New York/39/2012を比較対照としてHI試験を行ったところ、3株中1株はワクチン株とHI価で4倍以内の抗原性の差であり、ワクチン株とほぼ類似した株であったが、3株中2株についてはワクチン株と比べてHI価で8倍以上の差があり、抗原性が変異していると考えられた(表2)。

3・3 過去3シーズンにおけるインフルエンザウイルスA/H3亜型分離株の系統樹解析

3・2に示したとおり、2014/15シーズンの感染症発生動

向調査において検出されたインフルエンザウイルスの亜型は8割以上がA/H3亜型であり、また集団発生事例において検出された亜型は全てA/H3亜型であった。そこで、今回はA/H3亜型の2012/13シーズンから2014/15シーズンの過去3シーズンにおける県内の流行株について解析するため、インフルエンザウイルスのHA遺伝子の塩基配列についての系統樹解析を行った(図2)。

2012/13シーズンから2014/15シーズンに県内で分離された株は、他の国内で分離された株と同様に、すべてクレード3C.3または3C.2の2つの主要なクレードに属していた。系統樹の3C.3及び3C.2の各クレードのなかでも毎シーズンの流行株は変異している。国内では2013/14シーズン後半から新たなサブクレードである3C.2a及び3C.3aが認識され始めており⁶⁾、県内でも2013/14シーズンの分離株から3C.3aに属するものが確認された。2014/15シーズンに県内で分離された株はいずれも新たなサブクレード(3C.2aまたは3C.3a)に属しており、5株は3C.3a、1株は3C.2aであった。

国内で2014/15シーズン流行株の主流であったサブクレード3C.2a株は、赤血球凝集活性が極めて低く、HI試験による抗原性解析が困難であった株である⁶⁾。また、2014/15シーズンのワクチン株(A/ニューヨーク/39/2012)が属するクレードである3C.3からは系統樹上では明確に区別されている⁶⁾。

2014/15シーズン前半(12月～1月)に県内で分離された株はサブクレード3C.3aに属しており、2014/15シーズン

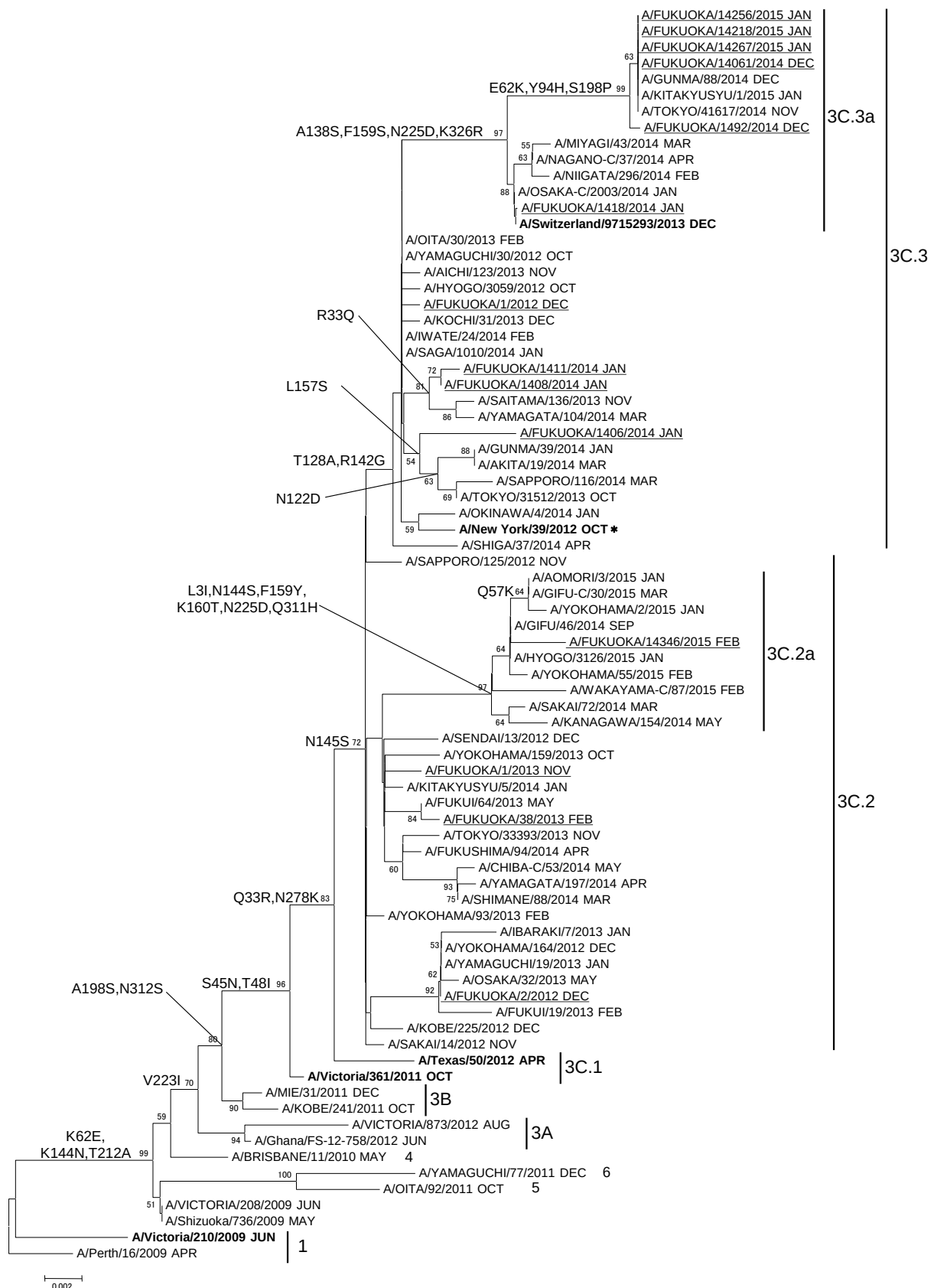


図2 インフルエンザウイルス A/H3 亜型の HA 遺伝子 (1024bp) 系統解析結果
 下線は、福岡県において 2012/2013, 2013/2014, 2014/2015 シーズンに分離された株
 * : 2014/15 シーズンのワクチン株

のワクチン株 (A/ニューヨーク/39/2012) と同じ 3C.3 のクレードではあるが、1 株は当所における抗原性解析において、抗原変異株 (ワクチン株と比べて 8 倍以上の差が見られた株) であった。国立感染症研究所による国内分離流行株の解析では、解析された株の約 78% が抗原変異株であったことが示されており⁶⁾、2014/15 シーズンの流行株は前シーズンの流行株から抗原性が大きく変化していると考えられた。

4 まとめ

2014/15 シーズンは、感染症発生動向調査では 8 割以上、インフルエンザ集団発生事例においては検出された全ての検体が A/H3 亜型であり、2012/13 シーズンから 2 シーズンぶりに A/H3 亜型が主流であった。流行開始時期は平年より 2 週間程度早い立ち上がりで、県内においても第 48 週頃からインフルエンザウイルスが検出され、2015 年の第 2～4 週頃がピークであった。

2014/15 シーズンに分離された A/H3 亜型について、塩基配列を決定し、系統樹解析を行った結果、5 株はサブクレード 3C.3a、1 株はサブクレード 3C.2a であった。サブクレード 3C.3a は、2014/15 シーズンのワクチン株 (A/ニューヨーク/39/2012) と同じ 3C.3 のクレードではあるが、国内分離株の多くが抗原性変異株であることがわかっており、2015/16 シーズン向けのワクチン株は、サブクレード 3C.2a に属する A/スイス/9715293/2013 に変更となった⁷⁾。次シーズンも引き続き、県内におけるインフルエンザの発生動向に注意し、遺伝子解析および抗原性解析を行っていく必要

がある。

謝辞

インフルエンザウイルスの系統樹解析にご協力いただきました国立感染症研究所の藤崎誠一郎氏に深謝致します。また、調査にあたり、検体採取にご協力頂きました医療機関及び保健 (福祉) 環境事務所の関係各位に深謝致します。

文献

- 1) 国立感染症研究所：インフルエンザウイルス分離・検出速報，<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-inf.html>
- 2) 世良暢之、江藤良樹、中山志幸ら：福岡県保健環境研究所年報，第 35 号，65-70，2008.
- 3) 吉富秀亮、石橋哲也、中村朋史ら：福岡県保健環境研究所年報，第 40 号，90-93，2013.
- 4) 吉富秀亮、吉山千春、濱崎光宏ら：福岡県保健環境研究所年報，第 41 号，88-89，2014.
- 5) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル (第二版)，2010 年 3 月.
- 6) 国立感染症研究所、厚生労働省結核感染症課：今冬のインフルエンザについて (2014/15 シーズン)，<http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/flutoppage/2066-idsc/related/5647-fludoko-2014.html>
- 7) 厚生労働省健康局長通知：健発 0508 第 1 号，2015 年 5 月.

(英文要旨)

Genetic Characterization of the Influenza Virus from the 2014/15 Winter Season in Fukuoka

Yuki ASHIZUKA, Hideaki YOSHITOMI, Asako NAKAMURA, Mitsuhiro HAMASAKI, Kazumi HORIKAWA, Nobuyuki SERA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

During the 2014/2015 influenza season in Fukuoka, influenza activity was dominated by the circulation of the influenza A/H3 virus. Patient numbers infected with this virus began increasing about 2 weeks earlier than commonly occurs for influenza outbreaks in most years. This virus was first detected in the 48th week of 2014, with patient numbers peaking between the 2nd and 4th week of 2015. Results of phylogenetic analyses of the hemagglutinin genes showed that isolates of A/H3 belonged to two different clades: 3C.2a and 3C.3a.

[Key words ; 2014/15 season, influenza, Isolation, Phylogenetic analysis]