

短報

福岡県で2015/16シーズンに検出されたインフルエンザウイルスについて

芦塚由紀・吉富秀亮・中村麻子・濱崎光宏・世良暢之

福岡県における2015/16シーズンのインフルエンザの流行は2016年の第1週頃から立ち上がり、定点当たりの報告数は2016年の第5週と9週頃がピークであった。流行の主流はA/H1pdm09亜型であった。流行株の抗原性を評価するため、A/H1pdm09亜型の分離株について抗原性解析を行った結果、すべてワクチン株類似株であった。また、流行株の遺伝的変化を調べるため、A/H1pdm09亜型の系統樹解析を行った結果、分離株はすべて近年の主流であるクレード6Bに属していたが、シーズン前半と後半の分離株では異なるアミノ酸変異を持つサブクレードであった。A/H1pdm09亜型についての薬剤耐性サーベイランスを実施した結果、タミフルに耐性を示すH275Yの変異を持った株は検出されなかった。

[キーワード：2015/16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。近年主に流行している季節性インフルエンザウイルスは、A型がA/H1pdm09亜型とA/H3亜型、B型はビクトリア系統と山形系統に分けられる。

2015/16シーズンは初期から全国的にA/H1pdm09亜型が流行した¹⁾。A/H1pdm09亜型は2009年に発生した新型インフルエンザウイルスで、2009/10シーズンの主流株であった。その後の流行状況は、2010/11シーズンにA/H1pdm09亜型とA/H3亜型の同時流行、2013/14シーズンにはA/H1pdm09亜型及びB型山形系統を中心とした4種のインフルエンザウイルスによる流行²⁾があった。

インフルエンザウイルスは、ウイルス遺伝子に起こる変異の蓄積によって、同一の亜型内でも抗原性は少しずつ変化し、毎年のように流行を繰り返す。そのため、ウイルスの型・亜型の検査だけでなく、シーズン毎の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、2015/16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流行状況の解析、シーズンの主流亜型であるインフルエンザウイルスA/H1pdm09亜型の県内分離株の抗原性解析、系統樹解析及び薬剤耐性変異の検出を行ったので報告する。

2 方法

2・1 検体及び患者情報

2015年第36週から2016年第23週に感染症発生動向調査

福岡県保健環境研究所 (〒818-0315 太宰府市大字向佐野 39)

において、福岡市と北九州市を除く県内の病原体定点医療機関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148件、その他1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(小学校及び中学校)における患者23名から採取された検体(うがい液)を検査した。

患者の臨床症状及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

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³⁾に準拠し、型・亜型の検査はリアルタイム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、赤血球凝集試験を実施した。凝集力価が8倍以上であった検体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

2015/16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A/H1pdm09亜型のヘマグルチニン(HA)遺伝子の塩基配列を決定し、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³⁾に準拠し、A/H1pdm09亜型の1085bpの塩基配列を決

定した。参照株（ワクチン株及び国内外の流行株）の遺伝子配列データはGlobal Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) EpiFlu database⁴⁾ からダウンロードした。系統樹は、近隣結合 (Neighbor-joining, NJ) 法により作成した。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 (MEGA 5.1) を使い、検定はブートストラップ法 (500回サンプリング) により行った。

2・4 抗インフルエンザ薬剤耐性サーベイランス

インフルエンザ診断マニュアル³⁾に従い、インフルエンザウイルスA/H1pdm09亜型のノイラミニダーゼ (NA) タンパク質における薬剤耐性変異について試験した。薬剤耐性変異の検出は、Allele-specific RT-PCR法により行い、H275Y タミフル耐性マーカーの有無を調べた。

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 79 名、女性 70 名の計 149 名で、年齢は 0~93 歳、平均年齢は 29.1 歳であった。臨床症状は、発熱が 144 名 (96.6%)、頭痛が 58 名 (38.9%)、関節痛が 41 名 (27.5%)、上気道炎が 75 名 (50.3%)、筋肉痛が 16 名 (10.7%)、下気道炎が 9 名 (6.0%)、及び胃腸炎が 12 名 (8.0%) であった。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 140 件を集計した結果、イナビルが 63 件 (47.7%)、タミフルが 47 件 (35.6%)、リレンザが 11 件 (8.3%)、ラビアクタが 5 件 (3.8%)、薬剤不明が 6 件 (4.5%) で、2013/14 シーズン、2014/15 シーズンと同様に、イナビルの使用率が最も高かった^{2),5)}。

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小学生 (6-7 歳) 9 名及び中学生 (12-14 歳) 14 名の合計 23 名で、内訳は男児 11 名、女児 12 名であった。臨床症状は、発熱が 23 名 (100%)、頭痛が 18 名 (69.6%)、関節痛及び筋肉痛が 8 名 (34.8%)、胃腸炎が 7 名 (30.4%)、上気道炎が 7 名 (30.4%)、結膜炎が 2 名 (8.4%) であった。抗インフルエンザ薬の服薬状況では、イナビルが 12 件

(52.2%)、タミフルが 4 件 (17.4%)、リレンザは 4 件 (17.4%)、服用無しが 2 名 (8.7%) であった。小学生にはタミフルが処方され、タミフルは原則 10 代には処方しないため中学生にはイナビルが多く使用されていた。

3・2 県内におけるインフルエンザの発生状況及びインフルエンザウイルスの遺伝子型・亜型の検査

図 1 に感染症発生動向調査週報から集計した 2015/16 シーズンの福岡県における定点当たり報告数及びインフルエンザウイルスの週別検出数を示した¹⁾。前シーズンは全国的に A/H3 亜型が主流であり⁵⁾、流行開始時期は平年より早い立ち上がりで、第 48 週頃から検出され、ピークは 2015 年の第 2-4 週であった。2015/16 シーズンは A/H1pdm09 亜型が主流で¹⁾、流行の立ち上がりはほぼ例年並みの 2016 年の第 1 週頃、ピークは第 5 週目と第 9 週目頃であった。

感染症発生動向調査で搬入された 149 件の遺伝子検査結果は 135 検体がインフルエンザ陽性で、A/H1pdm09 亜型が 95 件 (63.8%)、B 型ビクトリア系統が 17 件 (11.4%)、A/H3 亜型が 10 件 (6.7%)、B 型山形系統が 8 件 (5.4%)、A 型系統不明が 3 件 (2%)、B 型系統不明が 1 件 (0.7%)、陰性が 14 件 (9.4%) であった。インフルエンザ集団発生事例の初発は福岡ブロックで発生した第 49 週の事例であり、昨シーズン発生時期と同じであったが、北九州ブロックが 2016 年の第 2 週、筑後、筑豊ブロックが第 3 週と、例年と比べて比較的遅かった。前シーズンの集団発生事例は、すべて流行の主流の A/H3 亜型であったが、2015/16 シーズンは流行亜型である A/H1pdm09 による事例が 3 事例、B 型/ビクトリア系統による事例が 1 事例あった。

3・3 抗原性解析の結果

集団発生事例及び感染症発生動向調査事業において MDCK 細胞により分離されたインフルエンザウイルス A/H1pdm09 亜型の 43 株 (集団発生事例 9 株、感染症発生動向調査事業 34 株) について HI 試験により抗原性解析を実施した。A/H1pdm09 亜型のワクチン株である A/California/07/2009 を比較対照として HI 試験を行った。その結果、

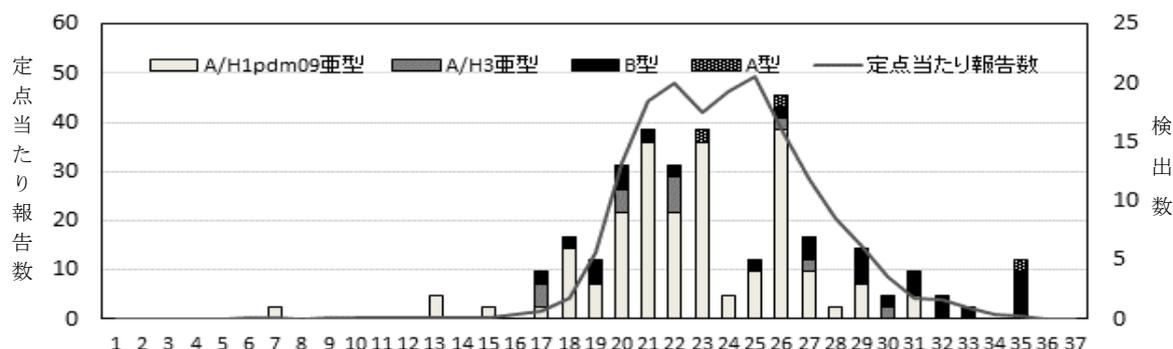


図 1 2015/16 シーズンの福岡県におけるインフルエンザの週別報告数及びインフルエンザウイルスの検出数

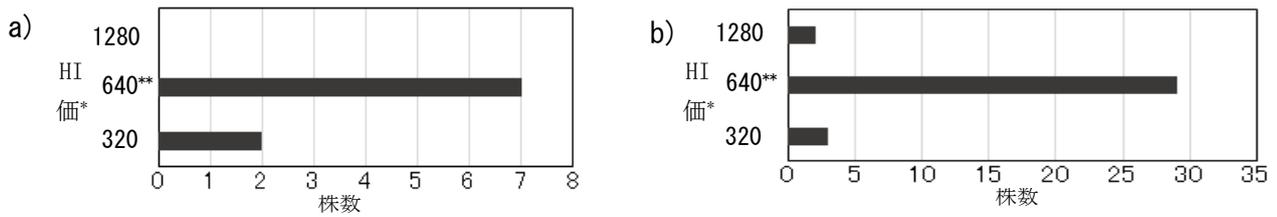


図2 インフルエンザウイルス分離株の赤血球凝集阻止 (HI) 試験の結果

a) 集団発生事例の分離株 b) 感染症発生動向調査事業の分離株
* 抗 A/California/07/2009 に対する HI 価 ** ホモ価

すべての分離株はワクチン株の HI 価 640 の 4 倍以内の抗原性の差であった (図 2)。標準株から 8 倍以上反応性の低下した株は抗原変異株とみなされることから、今回分離された株はすべてワクチン株類似株であった。

3・4 インフルエンザウイルス A/H1pdm09 亜型分離株の系統樹解析

2015/16 シーズンの主流型であるインフルエンザウイルス A/H1pdm09 亜型の県内における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 遺伝子の塩基配列の系統樹解析を行った (図 3)。

2015/16 シーズンの集団発生事例及び感染症発生動向調査事業で分離された株は、すべて 2013/14 から 2014/15 シーズンの国内流行株と同じクレードであるクレード 6B に属した。さらに、12 月と 1 月に発生した集団発生事例からの分離株 5 株については 2014/15 シーズン流行株と比較して V152T、V173I のアミノ酸変異をもつサブクレード 6B. 2 に属した。また、感染症発生動向調査事業からの分離株 5 株は、2014/15 シーズンのインド流行株と同じアミノ酸変異 (S84N) を持ち、加えて 2015/16 シーズンの初めに三重県⁶⁾や愛知県⁷⁾で分離された株と同じ S162N と I216T の変異も持つサブクレード 6B. 1 に属し、集団発生事例の分離株とは異なるグループであった。このことから、2015/16 シーズンの県内の流行株は 12-1 月の前半とそれ以降の後半で変わっていたことが推察される。

3・5 抗インフルエンザ薬剤耐性サーベイランス

インフルエンザウイルス A/H1pdm09 亜型の分離株について、NA タンパク質における H275Y タミフル耐性マーカーの有無を試験した。インフルエンザ集団発生事例で搬入された検体から分離された 8 株と、感染症発生動向調査事業で搬入された検体から分離された 36 株の合計 44 株について試験したところ、タミフルに耐性を示す H275Y の変異を持った株は検出されなかった。しかしながら、2015/16 シーズンに国内で H275Y/G147R の二重変異によりタミフルとラピアクタに対する交差耐性を持った株が見つまっていることから⁸⁾、今後も薬剤耐性株についてのサーベ

ランスの強化が必要と考えられる。

4 まとめ

2015/16 シーズンの県内で流行したインフルエンザウイルス A/H1pdm09 亜型の分離株について、抗原性解析、HA 遺伝子による系統樹解析及び薬剤耐性サーベイランスを実施した。抗原性解析を行った結果、2015/16 シーズンに分離された株はすべてワクチン株 A/California/07/2009 類似株であった。系統樹解析の結果では、今シーズンの分離株は近年の主流であるクレード 6B に属していた。ワクチン株と比較して抗原性には大きな変化は見られていないが、シーズン前半と後半の分離株は異なるアミノ酸変異をもったサブクレードに属していることから、県内の流行株はシーズンの途中で変わっていた可能性が示唆された。薬剤耐性サーベイランスにおいては、シーズンを通してタミフルに耐性を示す H275Y の変異を持った株は検出されなかった。

謝辞

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> 発生動向調査週報
- 2) 吉富秀亮ら：福岡県保健環境研究所年報，第 41 号，88-89，2014。
- 3) 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。
- 4) Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAI) EpiFlu database，<http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#58252d>
- 5) 芦塚由紀ら：福岡県保健環境研究所年報，第 42 号，69-73，2015。
- 6) 矢野拓弥ら：IASR，Vol. 36，223-224，2015。
- 7) 安井善宏ら：IASR，Vol. 36，224-225，2015。
- 8) E Takashita et al.：Eurosurveillance，21，2016。

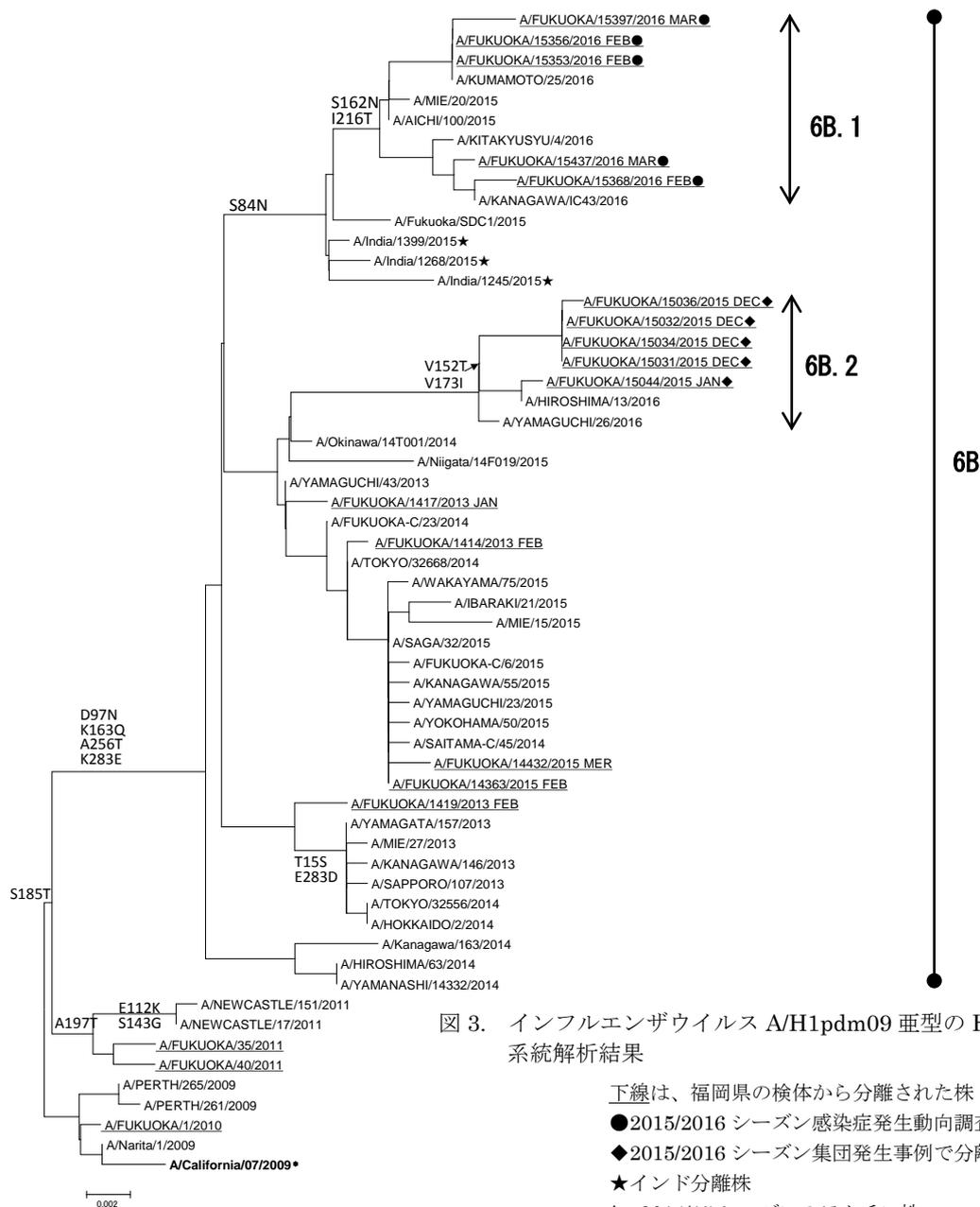


図 3. インフルエンザウイルス A/H1pdm09 亜型の HA 遺伝子 (1085bp) 系統解析結果

下線は、福岡県の検体から分離された株

●2015/2016 シーズン感染症発生动向調査事業で分離された株

◆2015/2016 シーズン集団発生事例で分離された株

★インド分離株

* : 2014/15 シーズンのワクチン株

(英文要旨)

Serologic and Genetic Characterization of Influenza Virus from the 2015/16 Season in Fukuoka, Japan

Yuki ASHIZUKA, Hideaki YOSHITOMI, Asako NAKAMURA,
Mitsuhiro HAMASAKI, and Nobuyuki SERA

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

Patient numbers infected with influenza virus began increasing in the first week of 2016, and peaked in the fifth and ninth weeks of 2016. Influenza activity was dominated by circulation of the influenza A/H1pdm09 virus. Serologic analyses showed that all strains of influenza A/H1pdm09 were similar to the vaccine strain for the 2015/16 season. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin genes showed that isolates of A/H1pdm09 belonged to clade B. Early and late season strains were in clusters with different amino acid mutations.

[Key words ; 2015/16 season, influenza, Isolation, serologic analyses, Phylogenetic analysis,]