

〔資料〕

石川県におけるインフルエンザの流行状況

— 2015/2016シーズン —

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 児玉 洋江・成相 絵里・崎川 曜子

〔和文要旨〕

2015/16シーズンの集団かぜの発生施設数および患者数、感染症発生動向調査事業のインフルエンザ累積患者報告数は、いずれも2011/12シーズンに次いで多かった。また、病原体定点から提出された115検体について、インフルエンザウイルスの遺伝子検査を実施した結果、AH1pdm09亜型が39検体、AH3亜型が7検体、B型山形が38検体、B型Victoriaが23検体から検出され、分離培養検査ではAH1pdm09亜型が37株、AH3亜型が6株、B型山形が34株、B型Victoriaが21株分離された。このうちの一部についてHA1遺伝子を解析した結果、国内の同シーズン流行株と遺伝学的に類似した株であった。また、分離したAH1pdm09亜型のうち1株が275H/Y mixtureであった。

キーワード：インフルエンザウイルス

1 はじめに

当センターでは、感染症発生動向調査事業において、インフルエンザの患者数調査のほか、病原体検査としてインフルエンザ患者（インフルエンザ様患者を含む）からのインフルエンザウイルスの遺伝子検出、分離・同定等の検査を実施している。また、そこで得られた結果は県ホームページでの公表や、県内関係機関や国立感染症研究所（以下、感染研）に報告するとともに、分離したウイルスの一部は、ワクチン開発、研究等に供するため感染研へ提供している。

本報では、2015/2016シーズン（以下、今シーズン）の石川県（以下、当県）におけるインフルエンザの流行状況と検出および分離されたウイルスの性状解析結果等について報告する。なお、本報ではシーズンの区切りを感染研にあわせ、第36週から翌年の35週までとした。

2 材料と方法

2・1 患者発生状況

(1) 集団かぜ患者発生状況

県健康推進課が実施している学校などを対象とした

「インフルエンザ様疾患発生報告」により、インフルエンザ様疾患による欠席等で学級閉鎖等の措置をとった施設数および患者数を把握した。

(2) インフルエンザ患者発生状況

感染症発生動向調査事業に基づく県内48カ所（小児科29カ所、内科19カ所）のインフルエンザ定点医療機関（以下、定点）におけるインフルエンザ患者報告数により把握した。

2・2 ウイルス検査

(1) 検体の採取

感染症発生動向調査事業に基づく県内5カ所（小児科3カ所、内科2カ所）のインフルエンザ病原体定点医療機関（以下、病原体定点）を受診したインフルエンザ（インフルエンザ様疾患を含む）患者から採取された咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液の計115検体を検査対象とした。

なお、検体は2015年第48週（11月23日～29日）から2016年第21週（5月23日～29日）までの間に採取された。これらの検体は、原則、感染症発生動向調査事業におけるインフルエンザ患者報告数が定点あたり1.0を超える

Prevalence of Influenza during 2015–2016 Season in Ishikawa Prefecture. by KODAMA Hiroe, NARIAI Eri and SAKIKAWA Yoko (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Influenza virus

までは病原体定点を受診した全てのインフルエンザ患者から、1.0を超えた後は病原体定点ごとに1週間に2～3人から採取された。

(2) 検査方法

ア インフルエンザウイルスの遺伝子検出および同定
インフルエンザウイルスの遺伝子検出および同定は、TaqMan Probeを用いたリアルタイム RT-PCR法により、A型ウイルスのM遺伝子および亜型 (A (H1N1) pdm09ウイルス (以下, AH1pdm09亜型), A (H3N2) ウイルス (以下, AH3亜型)) ならびにB型ウイルス2系統 ((山形系統ウイルス (以下, B型山形), Victoria系統ウイルス (以下, B型Victoria)) の赤血球凝集素遺伝子 (以下, HA遺伝子) の同時検出により行った。

リアルタイムRT-PCR法は7500Fast (Life Technologies社) を使用し、インフルエンザ診断マニュアル (第3版) (以下, 診断マニュアル)¹⁾ に従い実施した。なお、RNAの抽出にはQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN社) を用いた。

イ インフルエンザウイルスの分離および同定

インフルエンザウイルスの分離培養検査は、トリプシン添加MDCK細胞を用いて実施した。分離ウイルスの型・亜型別の同定は、培養上清の赤血球凝集価 (以下, HA価) (0.75%モルモット赤血球使用) が8以上の検体について、それを抗原として、感染研より分与された今シーズンのインフルエンザウイルス同定用キット (以下, 同定用キット) の抗血清との赤血球凝集抑制 (以下, HI) 試験によった。

なお、同定用キットに含まれるウイルス株は、今シーズンのワクチン株であるA/California/7/2009 pdm (AH1pdm09亜型), A/Switzerland/9715293/2013 (NIB-88) (AH3亜型), B/Phuket/3073/2013 (B型山形), B/Texas/02/2013 (B型Victoria) の計4株である。一方、抗血清はAH1pdm09亜型, AH3亜型, B型Victoriaについては上記各ワクチン株に対するウサギ免疫抗血清であり、B型山形については、上記ワクチン株に対するフェレット感染抗血清である。

また、AH3亜型については、近年の流行株であるclade3C. 2aに属するウイルスの大部分はHA価が低くHI試験が実施できない²⁾ことから、これらの培養上清の型・亜型別の同定については、上記HI試験に加え、全てアと同様にインフルエンザウイルスの遺伝子検出法により行った。

ウ HA遺伝子部分塩基配列の解析

各亜型ウイルスが分離された検体の一部を無作為に抽出し、診断マニュアルに従いインフルエンザウイルス分離株のHA1遺伝子領域の塩基配列について解析を行った。すなわち、RT-PCR法により分離株のHA1

遺伝子を増幅し、得られたPCR増幅産物をQIAquick PCR Purification kit (QIAGEN社) で精製した後、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit (LT社製) を用いて、GeneAmp PCR System 9700 (LT社製) によりサイクルシーケンス反応を行った。その後、反応産物をBigDye XTerminator (LT社製) で精製し、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザ (LT社製) により塩基配列を決定し、Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 6を用い、近隣結合法 (neighbor-joining method) により系統樹解析を実施した。なお、ワクチン株の塩基配列情報は、The Global Initiative on Sharing All Influenza Data (<http://platform.gisaid.org>) から入手した。

エ 薬剤耐性インフルエンザウイルスの検索

感染研による抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランス事業に基づき、分離した全てのAH1pdm09亜型について薬剤耐性遺伝子の検索を実施した。すなわち、2種類の異なる蛍光色素 (FAM; 耐性株Y275, VIC; 感受性株H275) で標識されたTaqMan Probeを用いたリアルタイム RT-PCR法を行い、Allele Discrimination解析によるノイラミニダーゼ遺伝子 (以下, NA遺伝子) のH275Y変異の検出を行った。さらに、H275Y変異を保有するウイルスについては、診断マニュアルに従い、NA遺伝子の部分シーケンス法を用いて波形の重複を確認した。なお、詳細な解析方法はウと同様に行った。

3 結果および考察

3・1 患者発生状況

(1) 集団かぜ患者発生状況

今シーズンの集団かぜの初発は2016年1月19日 (火) (第3週) に報告のあった5施設、87人であり、同週には合計8施設、145人の報告があった。その後、第6週 (2月8日～14日) の34施設、874人をピークとし、第17週 (4月25日～5月1日) まで発生は続いた (図1)。なお、初発の報告日は、過去5シーズンと比較した結果、最も遅かった³⁻⁷⁾。

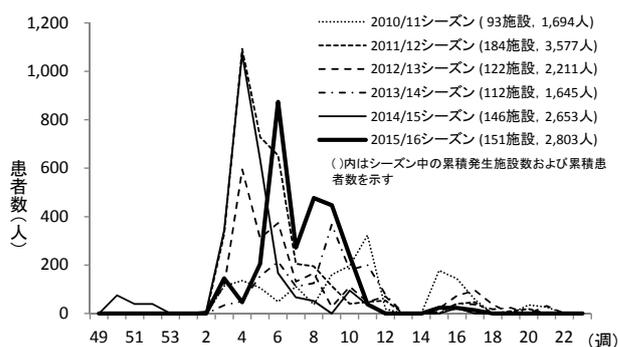


図1 集団かぜ患者発生状況(2010/11～2015/16シーズン)

最終的に今シーズンの集団かぜ発生施設数および患者数の合計は151施設、2,803人であった。これを過去5シーズンと比較した結果、施設数、患者数ともに2011/12シーズンに次いで多かった³⁻⁷⁾。

(2) インフルエンザ患者発生状況

感染症発生動向調査事業における定点あたりのインフルエンザ患者報告数は、2015年第50週(12月7日~13日)から増加し、2016年第2週(1月11日~17日)に流行開始の目安となる1.0を超え、2016年第8週(2月22日~28日)をピーク(定点あたり患者報告数48.9)に、その後減少した(図2)。なお、今シーズンの流行開始時期は、集団かぜ発生状況と同様に過去5シーズンで最も遅かった³⁻⁷⁾。

また、今シーズンの累積患者報告数は16,612人であり、過去5シーズンと比較した結果、2011/12シーズンに次いで多かった³⁻⁷⁾。

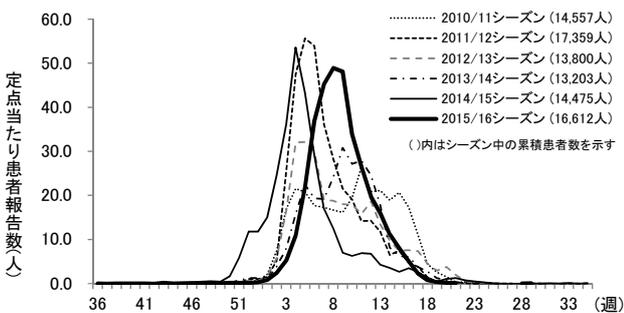


図2 感染症発生動向調査事業におけるインフルエンザ患者発生状況(2010/11~2015/16シーズン)

3・2 ウイルス検査

(1) 遺伝子検出結果

各病原体定点から提出された115検体について遺伝子検出を実施した結果、107検体(93.0%)からインフルエンザウイルス遺伝子が検出された。検出されたウイルスの型・亜型別の検体数(割合)は、AH1pdm09亜型が39検体(36.4%)、AH3亜型が7検体(6.5%)、B型山形が38検体(35.5%)、B型Victoriaが23検体(21.5%)であった。

A型ウイルスの主流はAH1pdm09亜型であり、2014/15シーズンの主流であったAH3亜型の検出は少なかった。一方、B型ウイルスについては、2012/13シーズン以降、B型山形が優勢であり、B型Victoriaが分離および検出される割合はいずれも10.0%以下であった^{3),6-7)}が、今シーズンはB型Victoriaの検出割合が21.5%と比較的多かった。なお、全国的にも今シーズンのB型ウイルスは、B型山形とB型Victoriaが拮抗した比率で混合流行していた⁸⁾。

検体提出週別に検出状況を見ると、2015年第48週(11月23日~29日)および第52週(12月21日~27日)に各1検体提出され、AH3亜型が検出されたが、2016年第2週(1月11日~17日)以降に提出された検体からは、主に

AH1pdm09亜型およびB型ウイルスが検出された(図3)。

なお、国内におけるインフルエンザウイルスの検出状況においても、ほぼ同様の傾向が報告されている⁸⁾。

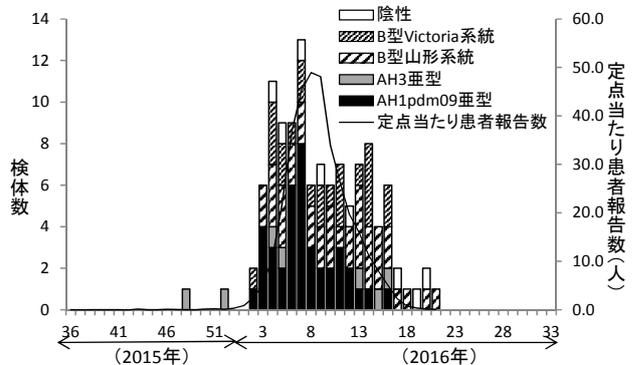


図3 インフルエンザウイルス検出数(検体提出週別)

例年はA型ウイルスが先行して流行し、遅れてB型ウイルスが流行することが一般的であるが、今シーズンは全国的に流行が遅れたことにより、A型とB型ウイルスがほぼ同時に流行したと推測される。

インフルエンザウイルス遺伝子が検出されなかった8検体の医療機関における迅速診断キットの結果は、B型陽性が5検体、A型およびB型陽性が2検体、不明が1検体であった。遺伝子検出および迅速診断キットの結果が不一致となった理由の一つとして、迅速診断キットの非特異反応による偽陽性の可能性が示唆され、その傾向はB型で多くみられた。

なお、これらの検体について、呼吸器感染症起因ウイルスであるアデノウイルス、RSウイルス、エンテロウイルス、ヒトパレコウイルス、ヒトメタニューモウイルスについて遺伝子検出を試みた結果、ライノウイルス遺伝子が3検体から、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス遺伝子がそれぞれ1検体から検出された。

(2) 分離および型別結果

115検体について分離培養検査を実施した結果、98検体(85.2%)からインフルエンザウイルスが分離された。分離されたウイルスの型・亜型別の株数は、AH1pdm09亜型が37株(37.8%)、AH3亜型が6株(6.1%)、B型山形が34株(34.7%)、B型Victoriaが21株(21.4%)であった。

分離されたウイルスの同定用キットの抗血清に対するHI価は、AH1pdm09亜型が640~1,280(ホモ価1,280)、B型山形が160~320(ホモ価320)、B型Victoriaが640~1,280(ホモ価1,280)であり、いずれもホモ価とほぼ一致していた。

一方、分離されたAH3亜型のうち、HA価が8以上でありHI試験による同定が実施できたのは1株(A/Ishikawa/9/2016)のみで、本株の抗血清に対するHI価は80(ホモ価2,560)であり、ホモ価と大きく乖離して

いた。なお、HA価が8未満であった5株については、いずれも培養上清を用いたインフルエンザウイルス遺伝子検出により同定した。

感染研では、国内で分離されたインフルエンザウイルスの一部について、フェレット感染抗血清を用いたHI試験により詳細な抗原解析を実施している。しかし、近年分離されるAH3亜型については、分離培養検査によりNA遺伝子に151D変異が生じ、本来は赤血球凝集活性をもたないNA遺伝子による蛋白が活性を示し、正確なHA価およびHI価の測定ができないことから、その影響を受けない中和試験により詳細な抗原性解析を実施している。

その結果、今シーズンはAH1pdm09亜型およびB型ウイルスの大部分はワクチン株に類似していたが、AH3亜型はワクチン株から抗原性が大きく変化していたことを報告している⁸⁾。

なお、当県で分離されたAH3亜型のうち、唯一HI試験が可能であったA/Ishikawa/9/2016について感染研が中和試験による抗原解析を行ったところ、ワクチン類似株と判定された。これは、前述の理由からHI試験では正確なHA価およびHI価の測定ができなかったことが要因と考えられる。

(3) HA遺伝子部分塩基配列の解析

インフルエンザウイルスが分離された98検体のうち、無作為に抽出した18検体（AH1pdm09亜型：4検体、AH3亜型：4検体、B型山形：5検体、B型Victoria：6検体）について、インフルエンザウイルスHA1遺伝子の部分塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。

解析の結果、AH1pdm09亜型 4株はいずれもK163Q, A256Tのアミノ酸置換を有するclade 6Bに属し、このうち3株はS84N, S162N, I216Tのアミノ酸置換を有する6B.1に、1株はV152T, V173Iのアミノ酸置換を有する6B.2に属していた（図4）。

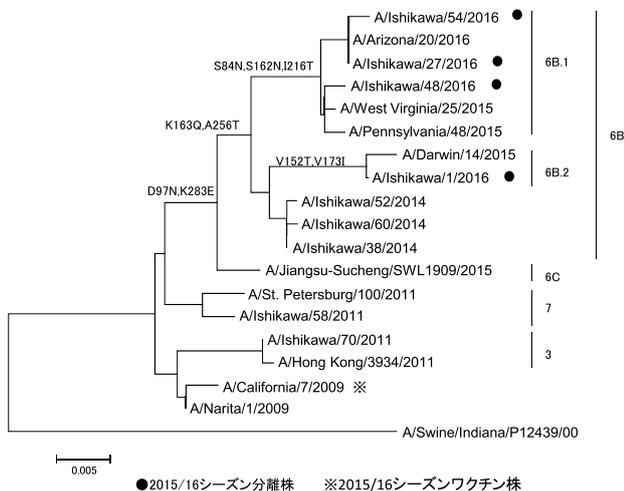


図4 AH1pdm09亜型ウイルス HA遺伝子の系統樹解析

AH3亜型 4株はいずれもVictoria/208 clade内で、今シーズンのワクチン株であるA/Switzerland/9715293/2013と同じQ33R, N278Kのアミノ酸置換を有するsubclade 3Cに属し、さらにL3I, N144S, F159Y, N225D, Q311Hのアミノ酸置換を有する3C.2aに属していた（図5）。

B型山形 5株は、いずれもS150I, N165Y, N202S, S229Dのアミノ酸置換を有する今シーズンのワクチン株であるB/Phuket/3073/2013と同じclade 3に属し、さらにL172Q, M251Vのアミノ酸置換を有していた（図6）。

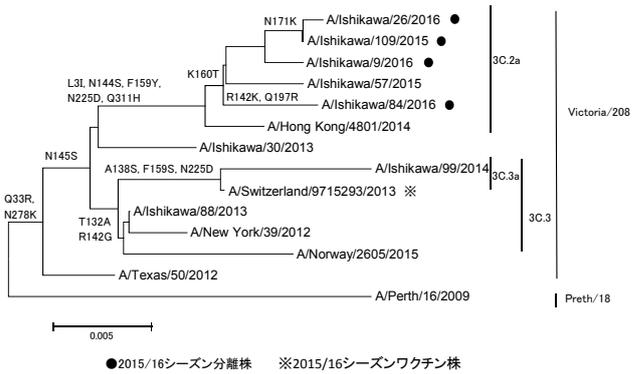


図5 AH3亜型ウイルス HA遺伝子の系統樹解析

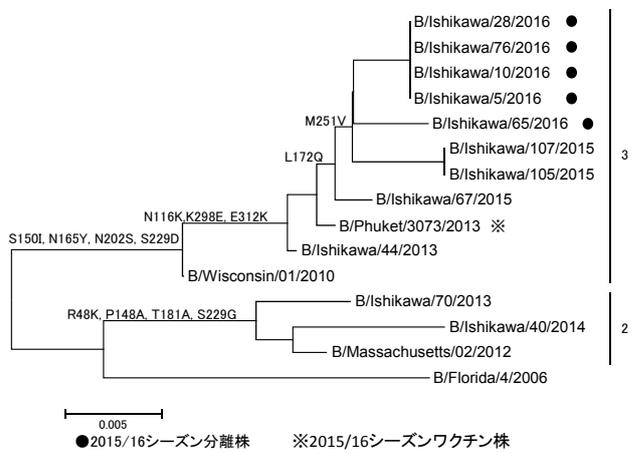


図6 B型山形系統ウイルス HA遺伝子の系統樹解析

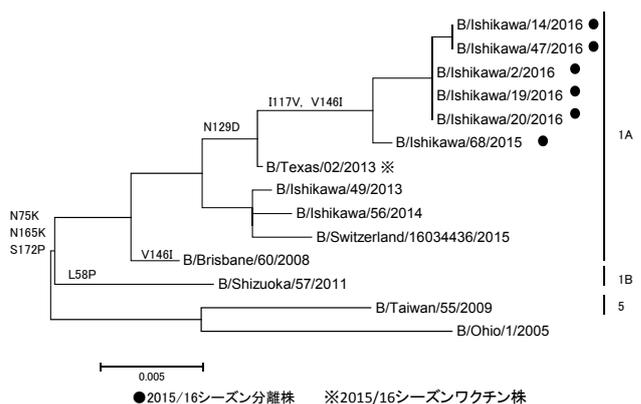


図7 B型Victoria系統ウイルス HA遺伝子の系統樹解析

B型Victoria 6株は、いずれもN75K, N165K, S172P, N129Dのアミノ酸置換を有する今シーズンのワクチン株であるB/Texas/02/2013cladeと同じclade1Aに属し、さらにI117V, V146Iのアミノ酸置換を有していた(図7)。

なお、今回我々が解析した株はいずれも、昨シーズンと同様のcladeに属しており、また国内外で流行した株と遺伝学的に類似していた⁸⁾。

(4) 薬剤耐性インフルエンザウイルスの検索

分離したAH1pdm09亜型 37株について、H275Y変異を検索した結果、Y275およびH275の混合株である275H/Y mixture が1株(2.7%)検出された。また、本株が分離された検体についても同様に検索した結果、275H/Y mixtureが検出された。

本株は、医療機関にてオセルタミビルを投与されてから4日後に採取された検体から分離されたウイルスであり、薬剤の選択圧により散発的に耐性変異株が発生したと推測された¹¹⁾。

抗インフルエンザ薬耐性サーベイランス事業に基づき、各地方衛生研究所にてAH1pdm09亜型のH275Y変異の検索を行うと同時に、感染研にて国内で分離された各亜型の一部について感受性試験が実施されている。その結果、今シーズンはすべての亜型で抗インフルエンザ薬耐性株の検出が散発的であったことが報告されている⁸⁾。しかしながら、2013/14シーズンには札幌市およびその周辺地域で抗インフルエンザ薬耐性株の流行がみられた¹⁰⁾ことから、今後も継続的な薬剤耐性インフルエンザウイルスのモニタリングが必要であると考えられる。

4 ま と め

今シーズンの当県における集団かぜ患者発生状況および感染症発生動向調査事業におけるインフルエンザ患者発生状況を過去5シーズンと比較した結果、いずれも流行開始時期は最も遅く、また、最終的にこれらの累積患者数等は、いずれも2011/12シーズンに次いで多かった。

A型ウイルスの主流はAH1pdm09亜型であり、B型ウイルスについてはB型山形が優勢であったが、B型Victoria検出割合の増加がみられた。

HA遺伝子を解析した結果、AH1pdm09亜型はclade6B.1および6B.2に、AH3亜型はclade 3C.2a, B型山形はclade3, B型Victoriaはclade1Aに属し、いずれも国内外で流行したウイルスに遺伝学的に類似していた。

分離したAH1pdm09亜型 37株についてH275Y変異を検索した結果、275H/Y mixture が1株検出された。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル(第3版)(2014)
- 2) 国立感染症研究所, 厚生労働省：今冬のインフルエンザについて(2014/15シーズン), 平成27年5月14日
- 3) 児玉洋江, 成相絵里, 崎川曜子：石川県におけるインフルエンザ流行状況(2014/15シーズン), 石川県保健環境センター研究報告書, **52**, 54-58(2015)
- 4) 児玉洋江, 谷村睦美, 橋本喜代一：石川県におけるインフルエンザ流行状況(2010/2011シーズン), 同上誌, **48**, 35-41(2011)
- 5) 児玉洋江, 成相絵里, 橋本喜代一：石川県におけるインフルエンザ流行状況(2011/12シーズン), 同上誌, **49**, 53-58(2012)
- 6) 児玉洋江, 成相絵里, 崎川曜子：石川県におけるインフルエンザ流行状況(2012/13シーズン), 同上誌, **50**, 54-58(2013)
- 7) 児玉洋江, 成相絵里, 崎川曜子：石川県におけるインフルエンザ流行状況(2013/14シーズン), 同上誌, **51**, 39-44(2014)
- 8) 国立感染症研究所, 厚生労働省：今冬のインフルエンザについて(2015/16シーズン), 平成28年8月31日
- 9) CHAMBERS Benjamin, LI Yang, HODINKA Richard, Hensleya Scott: Recent H3N2 Influenza Virus Clinical Isolates Rapidly Acquire Hemagglutinin or Neuraminidase Mutations When Propagated for Antigenic Analyses, *J Virol*, **88**, 10986-10989(2014)
- 10) TAKASHITA Emi, EJIMA Miho, ITOH Reiko, MIURA Mai, OHNISHI Asami, NISHIMURA Hidekazu, ODAGIRI Takato, TASHIRO Masato: A community cluster of influenza A (H1N1) pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill*. **19**:pii: 20666(2014).
- 11) 国立感染症研究所：新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)オセルタミビル耐性株(H275Y)の国内発生状況[第1報], 病原微生物検出情報, **31**, 49-53(2010年)