

[ノート]

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の性状解析

押部 智宏¹ 榎本 美貴¹ 高井 伝仕¹ 近平 雅嗣¹

岡藤 輝夫² 飯尾 潤³ 吉田 昌史¹

Characteristic Analysis of the Epidemic Influenza Viruses in Hyogo Prefecture, Japan during 2011/12 Season

Tomohiro OSHIBE¹, Miki ENOMOTO¹, Densi TAKAI¹, Masatsugu CHIKAHIRA¹,
Teruo OKAFUJI², Jyun IIO³ and Masashi YOSHIDA¹

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 *Hyogo Prefectural Tsukaguchi Hospital*

Influenza A(H3N2) and B virus (Victoria and Yamagata lineages) co-circulated in Hyogo prefecture, Japan during the 2011/12 flu season. The second largest number of cases with influenza infection in recent decade was reported from the sentinel clinics in Hyogo prefecture under National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease (NESID). Influenza viruses were isolated/detected from the 267 of 322 samples: 169 influenza A(H3N2), 56 influenza B(Victoria) lineage, and 42 influenza B (Yamagata) lineage viruses. In the antigenic analysis of influenza A(H3N2) virus, seventy three (54%) of 134 isolates showed reduced titers with antiserum produced against A/Victoria/210/2009 (2011/12 season Japanese vaccine strain). From the result of the phylogenetic analysis of HA genes, all 84 isolates fell into the Victoria/208 genetic clade and into sub-clade 3B, 3C, 3A, not into Preth/16 genetic clade including A/Victoria/210/2009. 24 (71 %) of 34 influenza B (Victoria lineage) isolates were antigenically similar to B/Brisbane/60/2008 (2011/12 season Japanese vaccine strain). The HA genes of all 33 isolates fell into Brisbane/60 genetic clade and sub-clade 1a. Twenty five (89 %) of 28 influenza B (Yamagata lineage) isolates were antigenically similar to B/Bangladesh/3333/2007 (reference strain). The HA genes of 26 isolates fell into genetic clade 2 and the other 2 isolates into B/Bangladesh/3333/2007 genetic clade (clade 3).

I はじめに

インフルエンザは、冬季に幼児や児童を中心に流行し、罹患しても通常 1 週間程度で軽快するが、高齢者や基礎疾患があると肺炎等を併発して死に至ることがある。

2009 年に出現した A(H1N1)pdm09 ウイルスは、2009/10 及び 2010/11 シーズンに兵庫県内でもインフルエンザ流行の主体となり^{1,2)}、出現から 3 シーズン目となる本シーズンも発生動向や病原性の変化が注目された。

また、依然として高病原性鳥インフルエンザ A(H5N1) ウイルスの人感染例が、インドネシア、ベトナム等の東南アジア地域やエジプトを中心に散発的に報告されている³⁾。2011 年 8 月からは、A(H1N1)pdm09 ウイルスの M 遺伝子を持つプタインフルエンザ A(H3N2)v ウイルスの人感染例が米国で複数報告されている^{4,5)}。さらに

¹ 感染症部 ² 岡藤小児科医院 ³ 兵庫県立塚口病院
* 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

2012年7月にはオハイオ州で行われた農業祭で豚に接触した人を中心にA(H3N2)vウイルスの集団感染が確認されるなど⁶⁾, 新型インフルエンザの出現に繋がる可能性のある変異が見られている。これらのウイルスを含めたインフルエンザの発生動向や性状変化について引き続き注視していく必要がある。

当所では、感染症発生動向調査の一環として病原体定点医療機関や健康福祉事務所で採取されたインフルエンザ様患者の検体について、ウイルス分離とその同定、抗原解析や遺伝子解析等のウイルスの性状解析を行ってきた。本稿では、2011/12シーズンにおけるこれらの結果について報告する。

II 材料と方法

1. 検体

2011/12シーズン（2011年第36週（9月5日～11日）から2012年第35週（8月27日～9月2日））に県内の病原体定点医療機関（21か所）で採取された287検体および小学校等の集団感染の疑いで健康福祉事務所が採取した35検体の合計322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, 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⁷⁾。細胞変性効果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^{8),9)}。

4. インフルエンザウイルス株の同定及び抗原解析

ウイルスのA(H1N1)pdm09, A(H3N2)型およびB型の同定及び抗原解析は、赤血球凝集抑制（HI）試験法を用いた^{8),9)}。標準抗血清は国立感染症研究所より分与された卵分離ウイルス株から作製した感染フェレット抗血清A/California/07/2009 A(H1N1)pdm09, A/Victoria/210/2009 A(H3N2), B/Brisbane/60/2008 (Victoria系統), B/Bangladesh/3333/2007 (山形系統)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で塩基配列を決定し、Neighbor-Joining法により系統樹解析を行った。クレード、サブクレードの名称及び代表株の選定等の分類法は、WHO London Influenza Centre (MRC)¹⁰⁾または国立感染症研究所の報告¹¹⁾に基づいた。また、ワクチン株、代表株等のHA遺伝子の塩基配列は、GISAID (The Global Initiative on Sharing All Influenza Data) のデータベース (EpiFlu™) より引用した。Fig. 5～7では、引用した株名の横に EpiFlu™ のIsolate IDを付した。

III 結果と考察

1. 県内のインフルエンザの流行状況

感染症発生動向調査事業による2009/10シーズンから2011/12シーズンまでの県内の医療機関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。

本シーズンの県内流行は、2011年第49週（12月5日～11日）に流行の開始の指標となる1.0人を超え、2012年第17週（4月23日～29日）まで続き、流行期間は21週間であった。

流行開始から7週後の第4週（1月23日～29日）（38.6人）に定点あたり30人以上の流行警報レベルを超え、第5週（1月30日～2月5日）に流行のピーク（42.5人）に達した。その後、患者数は減少して第9週（2月27日～3月4日）に流行警報レベルを下回った。警報レベルは4週間持続した。

本シーズンの定点あたりの累積患者数は353人で前シーズンの216人を上回り、過去10シーズンではA(H1N1)pdm09が出現した2009/10シーズンの405人に次ぐ2番目に規模の大きい流行となった。

2. 県内のインフルエンザウイルス分離・検出状況

本シーズンの当研究センターにおけるインフルエンザ

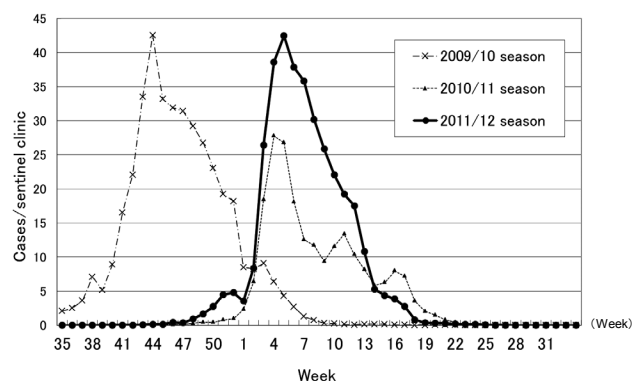


Fig. 1 Weekly cases of influenza-like illness per sentinel clinic from 2009/10 season to 2011/12 season in Hyogo prefecture.

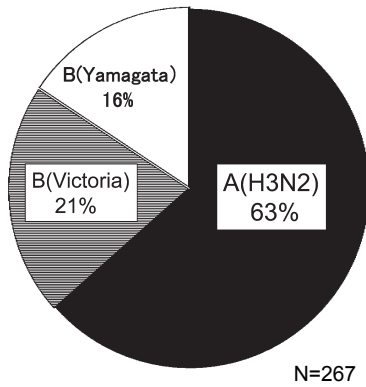


Fig. 2 Proportion of isolation/detection of influenza virus during 2011/12 season in Hyogo prefecture, Japan.

ウイルスの検出状況をFig. 2に示した。

搬入された322検体のうち267検体 (82.9%) からインフルエンザウイルスが検出された。ウイルスの型及び亜型別の内訳 (割合) は、A(H3N2)型が169 検体 (63%)、B型 (Victoria系統) が56検体 (21%)、B型 (山形系統) が42検体 (16%) であった。2008/9シーズンまで継続して検出された季節性のA(H1N1)型 (Aソ連型) は、前シーズンに続いて今シーズンも検出されなかった。また、前シーズンの流行の主体となったA(H1N1)pdm09も検出されず、全国的にもインフルエンザウイルスが検出された5,457検体中9検体 (0.2%) と極めて少なかった¹¹⁾。

一方、陽性検体に占めるB型の割合は、前シーズンの18%から37%に増加した。また、前シーズンに検出されたB型の96% (50検体/52検体) がVictoria系統であったが、本シーズンは山形系統の比率が43% (42検体/98検体) と大幅に増加し、Victoria系統と山形系統の混合流行となった。

インフルエンザウイルスの分離・検出状況を週別にみると (Fig. 3), A(H3N2)型は2011年第47週 (11月21日～27日) から2012年第12週 (3月19日～25日) までのインフルエンザの流行期間の毎週連続して検出された。検出数は徐々に増加し、第3週 (1月16日～22日) がピークとなり、その後減少した。

一方、B型の最初の検出は第51週 (12月19日～25日) で、その後、年明けの第4週 (1月23日～29日) から第15週 (4月9日～15日) まで連続して検出された。B型の検出の増加はA型が減少する第4週から始まり、ピークは第7週 (2月13日～19日) であった。それ以降の検出数は、A(H3N2)型を上回った。また山形及びVictoria系統共に検出のピークは第7週になるなど、両者はほぼ同じ比率で推移していることから、両系統が期間を通して混合流行していたと考えられた。

これらの結果から、A(H3N2)型が、シーズン当初から流行のピークにかけて主流となっていたが、第7週以降の流行の後半は、B型が主体となって両系統が混合流行していたと考えられた。

3. 県内分離ウイルス株の抗原解析

2011/12シーズンに県内で分離されたインフルエンザウイルス株の抗原解析の結果をFig. 4に示した。

A(H3N2)型ウイルス分離株の抗原性について、本シーズンのワクチン株であるA/Victoria/210/2009 の抗血清によるHI試験により、分離株とワクチン株とのHI価の差を比較した。解析した134株のうち抗原性がワクチン株類似と判断されるHI価の差が4倍以内の株は61株 (46%) であった。同一のワクチン株が昨シーズンも採用

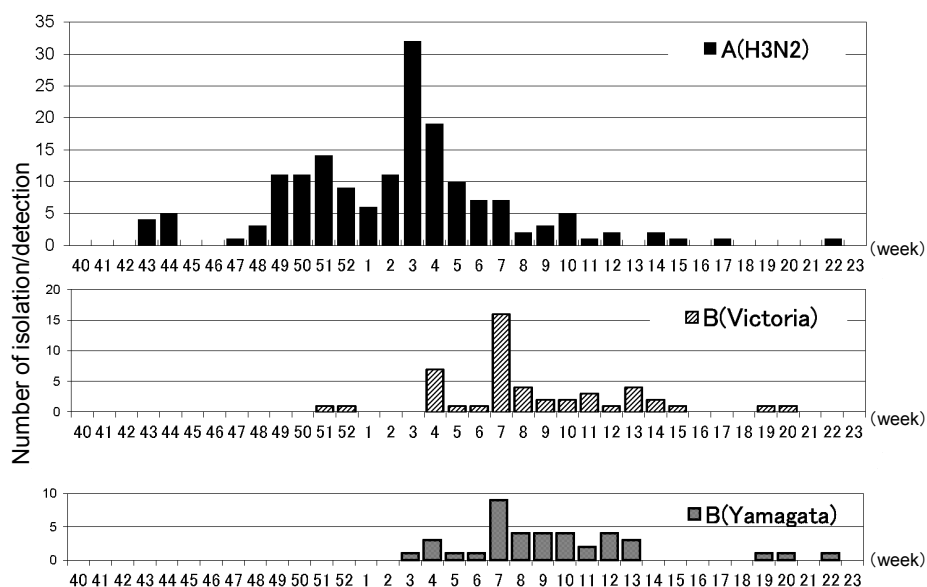


Fig. 3 Weekly isolation/detection of influenza virus during 2011/12 season in Hyogo prefecture, Japan.

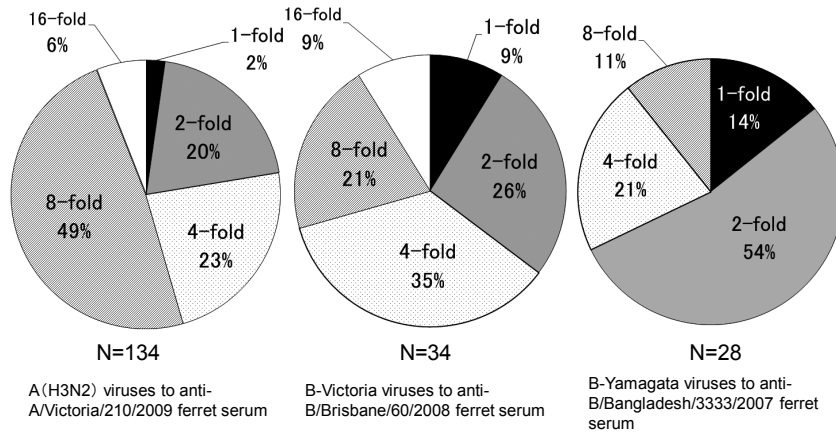


Fig. 4 The difference of HI titers of influenza virus isolated in 2011/12 season to the reference antisera.

されたが、その時の解析ではすべての県内分離株の抗原性がワクチン類似²⁾であったことから、本シーズンの分離株は昨シーズンより抗原変異が進んでいることが判明した。

本シーズンの全国でのA(H3N2)型ウイルス株について国立感染症研究所が実施した抗原解析では、64%がワクチン類似株で当所より高い類似性が示された¹⁾。最近のA(H3N2)型ウイルスは、鶏卵でウイルスを分離するとHAタンパクのレセプター結合部位周辺にある抗原サイトB領域やその近傍でアミノ酸置換が生じ易く、ヒトのウイルスの抗原性を反映しているMDCK細胞での分離株に比べて抗原性の変化が大きくなるとされている¹⁾。当所のワクチン類似株の比率の方が国立感染症研究所の結果よりも19%低い、これは当所で使用した抗血清が卵分離株から作製されたものであることが一因と考えられた。

B型 (Victoria系統) のワクチン株であるB/Brisbane/60/2008の抗血清によるHI試験では、解析した34株のうち、24株 (71%) がHI価との差が4倍以内のワクチン類似株であった。一方、国立感染症研究所が行った全国の分離株の抗原性解析では、99.5%がワクチン類似株であった¹⁾。

B型 (山形系統) のレファレンス株であるB/Bangladesh/3333/2007の抗血清によるHI試験では、解析した28株のうち25株 (89%) がHI価の差が4倍以内のワクチン類似株であった。国立感染症研究所による全国の分離株の解析では、97%がワクチン類似株であった¹⁾。

4 県内分離ウイルス株の遺伝子解析

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。

近年分離されるA(H3N2)型ウイルスはPerth/16クレードとVictoria/208クレードに大別されている。本シーズンのワクチン株であるA/Victoria/210/2009株が属するPerth/16クレードはHAタンパクにE62K及びN144Kのアミノ酸置換があり、Victoria/208クレードはT212Aのアミノ酸置換が見られる。このVictoria/208クレ

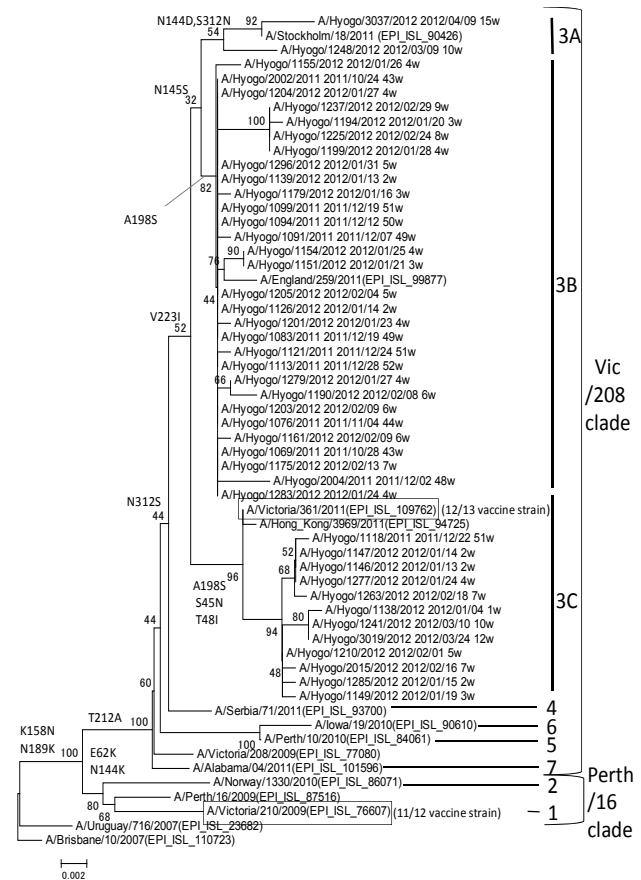


Fig. 5 Phylogenetic analysis of influenza A(H3N2) HA genes(HA1).

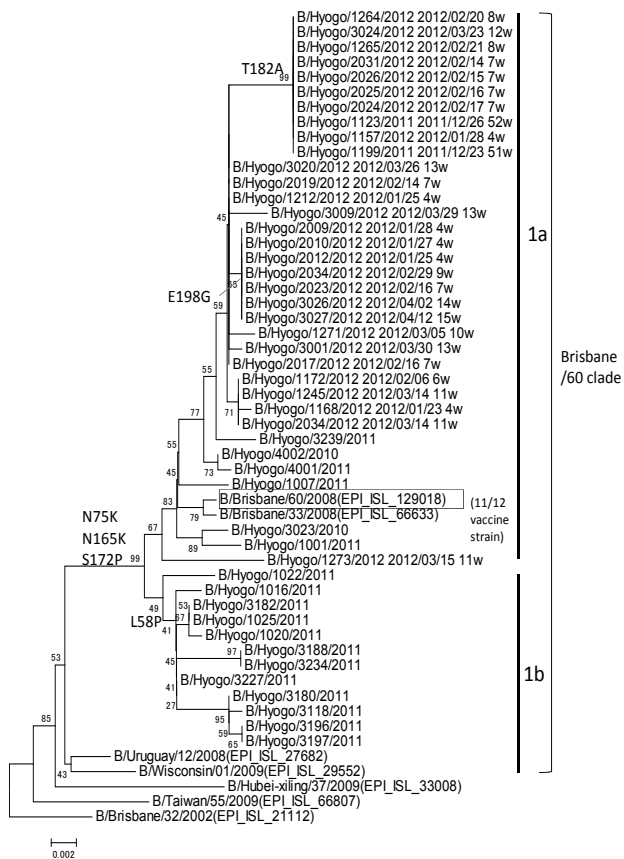


Fig. 6 Phylogenetic analysis of influenza B (Victoria-lineage)HA genes(HA1).

ードはさらに3~7のクレードに区分され、この中のクレード3はさらに3A, 3B, 3Cのサブクレードに分類されている^{10,11)}。

県内分離株をこれらのクレードに分類してみると、2010/11シーズンの分離株はPerth/16及びVictoria/208のクレードの株が混在しており、このうちVictoria/208クレードの株はサブクレード4, 5, 6の何れかに分類された²⁾。一方、本シーズンの84株はすべてVictoria/208クレードに属し、ワクチン株とは異なるクレードであった。これらはサブクレード3Bが59株(70%)で最も多く、サブクレード3Cが23株(27%)、サブクレード3Aが2株(2%)であった。検体採取週毎にこれらのクレードを見るとサブクレード3B及び3Cはシーズンを通して検出され、2株のサブクレード3Aは、第10週及び第15週で共に流行の後期に分離された。

県内で分離されたA(H3N2)型ウイルスの遺伝子系統樹解析では、すべての株はワクチン株とは異なるクレードとなっており、前シーズンの分離株よりアミノ酸の置換が進んでいることが判明した。また、抗原性解析の結果においても本シーズンは昨シーズンより抗原変異が進んでおり、遺伝子解析の結果が裏付けられた。本シーズンは過去10シーズンで2番目の流行となり、その流行の主

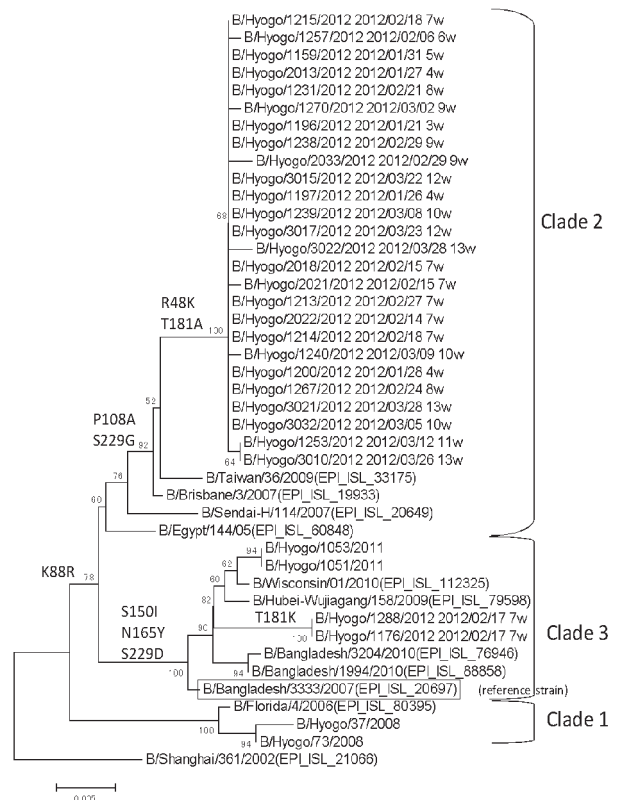


Fig. 7 Phylogenetic analysis of influenza B (Yamagata-lineage)HA genes(HA1).

体はA(H3N2)型であった。これはHAタンパクのアミノ酸置換を主体としたウイルスの抗原性の変化によることが一因と考えられる。来シーズンのワクチン株は、これまでA/Victoria/210/2009株から、本シーズンの分離株の27%を占めたサブクレード3Cに属するA/Victoria/361/2011株が新たに選定されたことから¹¹⁾、流行株とワクチン株の抗原性の乖離は解消されると思われる。

B型Victoria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. 6に示した。

Victoria系統は、ワクチン株のA/Victoria/210/2009株が属するN75K, N165K, S172Pのアミノ酸置換を持つBrisbane/60クレードや台湾/55クレード等に区別される。Brisbane/60クレードは、さらに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に分けられる¹¹⁾。前シーズンの県内の分離株は、すべてBrisbane/60クレードに属しており、サブクレード1aと1bの株が混在した²⁾。一方、本シーズンは、解析した33株すべてがBrisbane/60クレードのサブクレード1aに属しており、これに追加してT182Aのアミノ酸置換を持つ株が15株、E198Gのアミノ酸置換を持つ株が9株あった。これらのアミノ酸置換によるHI価の差は見られず、抗原

性に変化は認められなかった。

B型山形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。

山形系統はB/Florida/4/2006株に代表されるクレード1, HAタンパクのP108A, S119Gのアミノ酸置換を特徴とするクレード2, S150I, N165Y, S229Dのアミノ酸置換を持つクレード3に区分される¹⁴⁾が, 本シーズンの分離株は解析した28株中26株がクレード2に, 2株がクレード3に属していた。今回のクレード2に属する株はR48K及びT181Aのアミノ酸置換を伴っていた。

クレード3は, N202Sを持つサブクレード, T181Kを持つサブクレード, V29A, L172Q及びM251Vのアミノ酸置換を持つサブクレードの3つに区分され¹⁴⁾, 本シーズンの分離株は2株共にT181K置換のサブクレードに属していた。本シーズンの全国の解析結果では, 多くの株はN202Sのサブクレードに属していた¹⁴⁾。前シーズンの県内分離株は, 解析した2株共にクレード3の N202S置換のサブクレードに属し, さらにN116Kの置換を伴っていたことから, 本シーズンのサブクレードとは異なっていた。今回の山形系統のクレード2とクレード3に属する株間にHI価の差はなく, 抗原性の変化は認められなかった。

IV 要 旨

兵庫県における2011/12シーズンのインフルエンザの流行は, 過去10シーズンで2番目に規模の大きい流行となり, A(H3N2)型, B型Victoria系統と山形系統のウイルスによる混合流行であった。

A(H3N2)型ウイルス株は, HI試験による抗原性解析の結果, 解析した134株のうち73株 (55%) が, ワクチン株のA/Victoria/210/2009株に対して8倍以上抗原性が異なっていた。HA遺伝子の系統樹解析では, 解析したすべての株が, ワクチン株のクレードとは異なるVictoria/208クレードに属し, 3B, 3C, 3Aの何れかのサブクレードに属した。B型Victoria系統の分離株では, 解析した34株中24株 (71%) が, ワクチン株であるB/Brisbane/60/2008類似株であった。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型山形系統の分離株では, 解析した28株中25株 (89%) が, レファレンス株であるB/Bangladesh/3333/2007類似株であった。HA遺伝子の系統樹解析では, 分離株の大半が, クレード2に属していた。

文 献

- 1) 押部智宏, 齋藤悦子, 榎本美貴, 高井伝仕, 山口幹子, 山本昭夫, 沖 典男, 辻 英高, 岡藤輝夫, 飯尾 潤, 近平雅嗣: 兵庫県における2009/10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, **2**, 1-4 (2011)
- 2) 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)
- 3) WHO: Influenza and the human-animal interface Summary and assessment as of 17 December 2012 http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_17Dec12.pdf
- 4) 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)
- 5) Limited human-to-human transmission of novel influenza A (H3N2) virus—Iowa, November 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, **60**, 1615–7 (2011)
- 6) 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)
- 7) 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センター紀要, **4**, 54-57 (2007)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) WHO influenza centre London: Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northe-

rn Hemisphere interim-report-feb-2012,
[http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/
interim-report-feb-2012.pdf](http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/interim-report-feb-2012.pdf)

11) IASR病原微生物検出情報（月報），**33**，第11号，
285-300 (2012)

[平成25年3月22日受理]