

兵庫県における 2016/17 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 稲田 忠明

Characteristic Analysis of the Seasonal Influenza Viruses in Hyogo Prefecture, Japan, during the 2016/17 Season

Tomohiro OSHIBE*, Miki OGI, Denshi TAKAI, Masatsugu CHIKAHIRA
and Tadaaki INADA

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 2016/17 influenza season was the second smallest in the past 5 seasons. The AH3 subtype (80%) predominated over B (Victoria lineages) (12%), B (Yamagata lineages) (5%) and AH1pdm09 (3%) viruses.

The HA genes of AH1pdm09 viruses fell into the genetic subgroups 6B.1. The HA genes of AH3 viruses fell into the phylogenetic clade 3C.2a including A/Hong Kong/4801/2014 (2016/17 and 2017/18 season vaccine strain).

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 (2015/16~2017/18 season vaccine strain).

I はじめに

インフルエンザは、38℃以上の発熱、頭痛、全身倦怠感・筋肉痛・関節痛を主症状とする疾患であり、稀に肺炎、急性脳症等を併発して重症化することがある。この病原となる季節性のインフルエンザウイルスは、A型及びB型の2つの型に分類され、さらに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AH1pdm09とA香港型（以下AH3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少しずつ変異を繰り返すことから、流行するウイルスのタイプ、遺伝子変異、

抗原性の性状変化を把握することは、次季のワクチン株の選定等のインフルエンザ対策を行う上で重要である。

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2016/17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

2016/17 シーズン（2016 年第 35 週（8 月 29 日～9 月 4 日）から 2017 年第 34 週（8 月 21 日～27 日））に県内の指定提出機関（21 か所）で採取された 286 検体及び小学校等の施設での集団感染の疑い事例、重症例等で健康福祉事務所が採取した 10 検体の合計 296 検体を材料とした。

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

2. インフルエンザウイルスの遺伝学的同定検査

AH1pdm09, AH3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¹⁾。

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²⁾、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、1.0%モルモット赤血球あるいは 0.5%ニワトリ赤血球による赤血球凝集試験 (HA) を行った^{3,4)}。

4. インフルエンザウイルス株の同定

AH1pdm09, AH3型及びB型の同定は、赤血球凝集抑制 (HI) 試験法を用いた^{3,4)}。同定用の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 (H1pdm09), A/Hong Kong/4801/2014 (H3), B/Texas/2/2013 (Victoria 系統) 及び B/Phuket/3073/2013 (Yamagata 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、最尤法により系統樹解析を行った。解析に用い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^{5,6)}。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。

6. 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) した株を検出した¹⁾。

Ⅲ 結果及び考察

1. 県内のインフルエンザの流行状況

2014/15シーズンから本シーズンまでの感染症発生动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数を Fig. 1 に示した。

定点あたりの週別患者数は、全国の調査よりも1週遅く2016年第47週 (11月21日~27日) に流行開始の指標となる1.0人を超え、過去5シーズンで最も早い流行となった⁷⁾。その後急速に増加し全国と同じく2017年

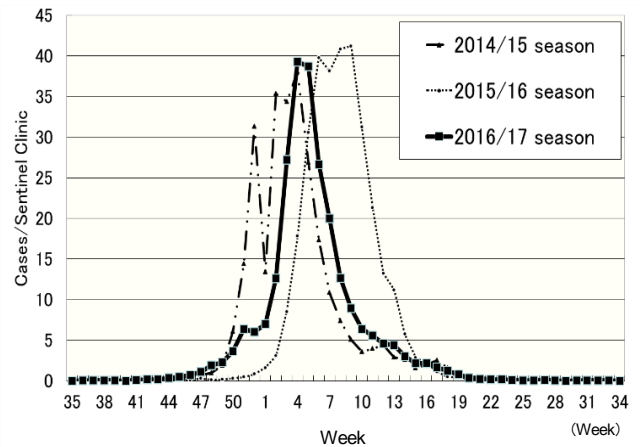


Fig. 1 Weekly cases of Influenza-like illness per sentinel clinic from 2014/15 season to 2016/17 season in Hyogo prefecture, Japan

第4週 (1月23日~29日) に警報水準とされる定点あたり30人を超えてピークを迎えた⁷⁾。ピークの値は39.3人となり、過去5シーズンでは2015/16シーズンの40.8人に次ぐ高さであった。第5週 (1月30日~2月5日) からは減少に転じ、第6週 (2月6日~12日) は26.6人となり警報水準を下回った。警報水準の持続期間は2週間であり過去3シーズンで最も短かった。

その後は徐々に減少して第19週 (5月8日~14日) に患者数1.0人未満となった。本シーズンの流行期間は24週間で、過去5シーズンの中で最長であった。この期間の定点あたり累積患者数は244人と過去5シーズンで2012/13シーズンの211人に次いで2番目に少なかった。

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 に示した。

検査した296検体のうち287件 (97%) 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238件 (83%)、B型が49件 (17%) で、A型が多く検出された。全国の調査でもA型が88%、B型が12%でA型が多く検出された⁷⁾。

過去のB型の検出割合をみると、12/13シーズンは全検出数の32%⁸⁾、13/14シーズンは45%⁹⁾、14/15シーズンは24.5%¹⁰⁾、15/16シーズンは44%を占めていたが¹¹⁾、本シーズンは直近の5シーズンで最も低かった。

本シーズンの亜型 (系統) の内訳は、AH3型が229件 (80%)、B型 (Victoria 系統) が34件 (12%)、B型 (Yamagata 系統) が15件 (5%)、AH1pdm09が9件 (3%) であり、AH3型の検出割合が最も高かった。

各亜型の検出状況を過去のデータと比較すると、A型は2012/13シーズンはAH3型が主流となり⁸⁾、2013/14シーズンはAH1pdm09⁹⁾、2014/15シーズンはAH3型¹⁰⁾、

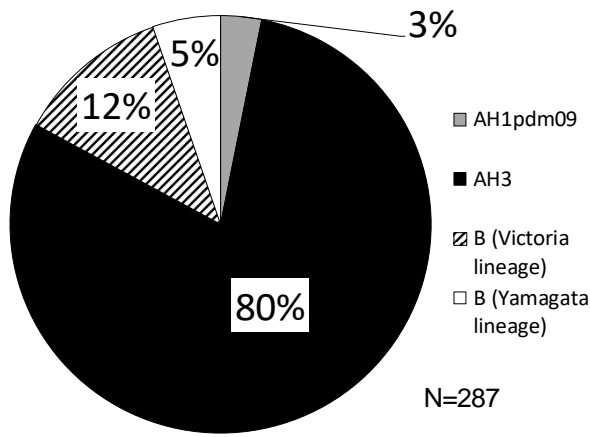


Fig. 2 Proportion of isolation/detection of influenza virus during 2016/17 season in Hyogo prefecture, Japan

2015/16シーズンはAH1pdm09が主体となっており¹¹⁾, 2012/13シーズン以降は, これらの亜型が隔年おきに流行するパターンとなっていたが, 本シーズンはAH3型の流行となり, 同様に隔年おきのパターンとなった。

一方, B型は, 2013/14シーズンはYamagata系統が67%⁹⁾, 2014/15シーズンはYamagata系統が91%¹⁰⁾, 2015/16シーズンはYamagata系統が64%を占めており¹¹⁾, 2013/14シーズン以降はYamagata系統が優勢であった。本シーズンは4シーズンぶりにVictoria系統が69%と多くを占めた。全国の調査でもVictoria系統が61%と優勢となっており⁷⁾, 県内と同様であった。

3. 週別のインフルエンザウイルスの分離・検出状況
本シーズンの週別のインフルエンザウイルスの分離・検出状況をFig.3に示した。

本シーズンは第35週から調査が開始されたが, AH3型は第39週(9月26日~10月2日)に本シーズン初めて検出され, その後も散発的に検出され, 流行開始前の第46週までに12件検出された。

流行開始の第47週から第4週のピークを過ぎて減少に転じる第5週までの期間は, AH3型が127件, AH1pdm09が1件で, B型は検出されなかった。

その後, 警報水準を下回った第6週から流行が持続した第18週までの期間は, AH3型が89件, B型(Victoria系統)が31件, B型(Yamagata系統)が14件, AH1pdm09が5件で4種類のウイルスが検出された。

全検出数の80%を占めたAH3型は, 流行開始の第47週から第18週の終息までの全期間にわたり連続して検出され, 第51週にAH1pdm09が1件検出された以外は第39週から第5週まで全てAH3型が占めた。一方, AH1pdm09は主に流行後半から終息後に散発的に検出された。

B型は, 流行ピーク後の第6週から検出され始め, 第20週まで連続して検出された。例年, ピーク後の後半の流行は, B型の検出数がA型を上回り主流となるケースが多いが, 本シーズンではB型の検出割合が低く, B型による流行は例年より小規模であった。

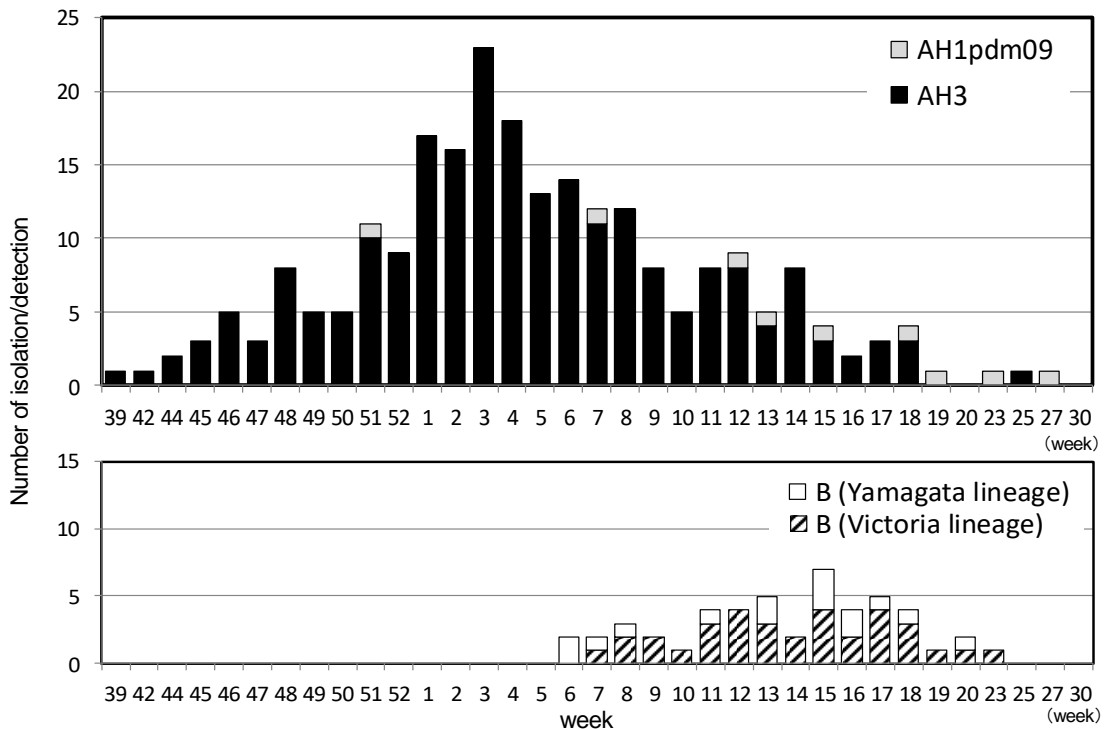


Fig. 3 Weekly isolation/detection of influenza virus during 2016/17 season in Hyogo prefecture, Japan

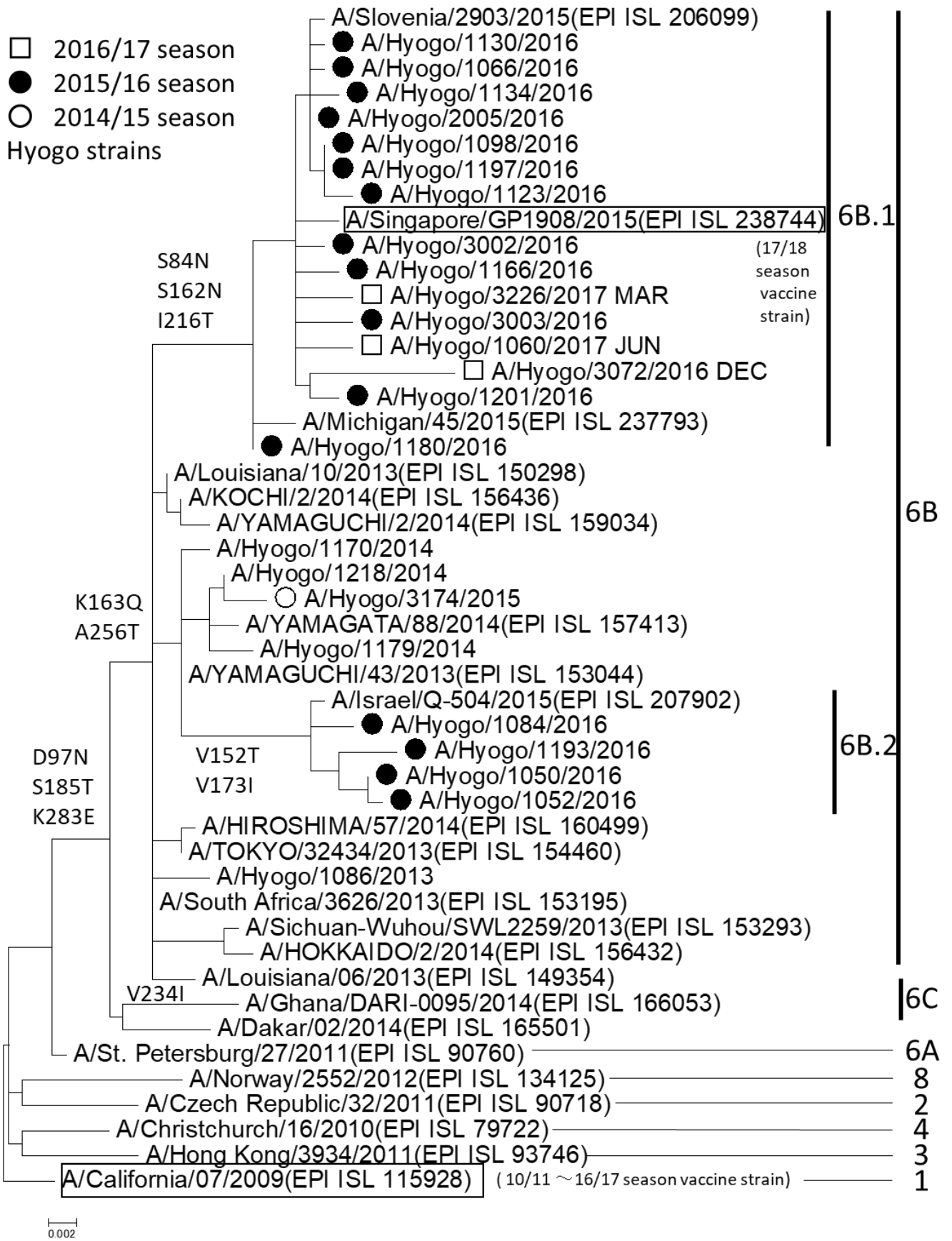


Fig.4 Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1)pdm09 HA genes (HA1)

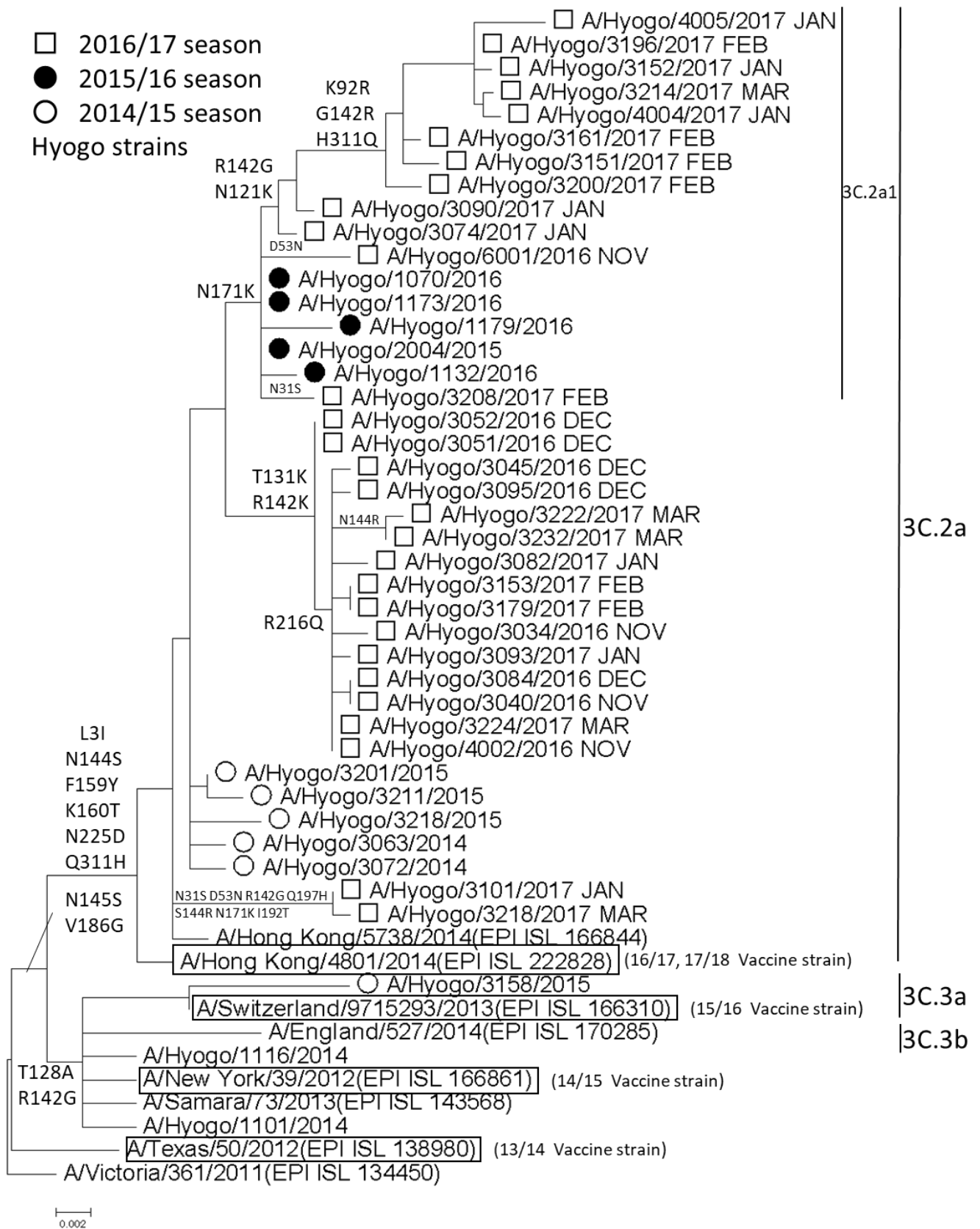


Fig.5 Phylogenetic analysis of influenza A(H3N2) HAgenes (HA1)

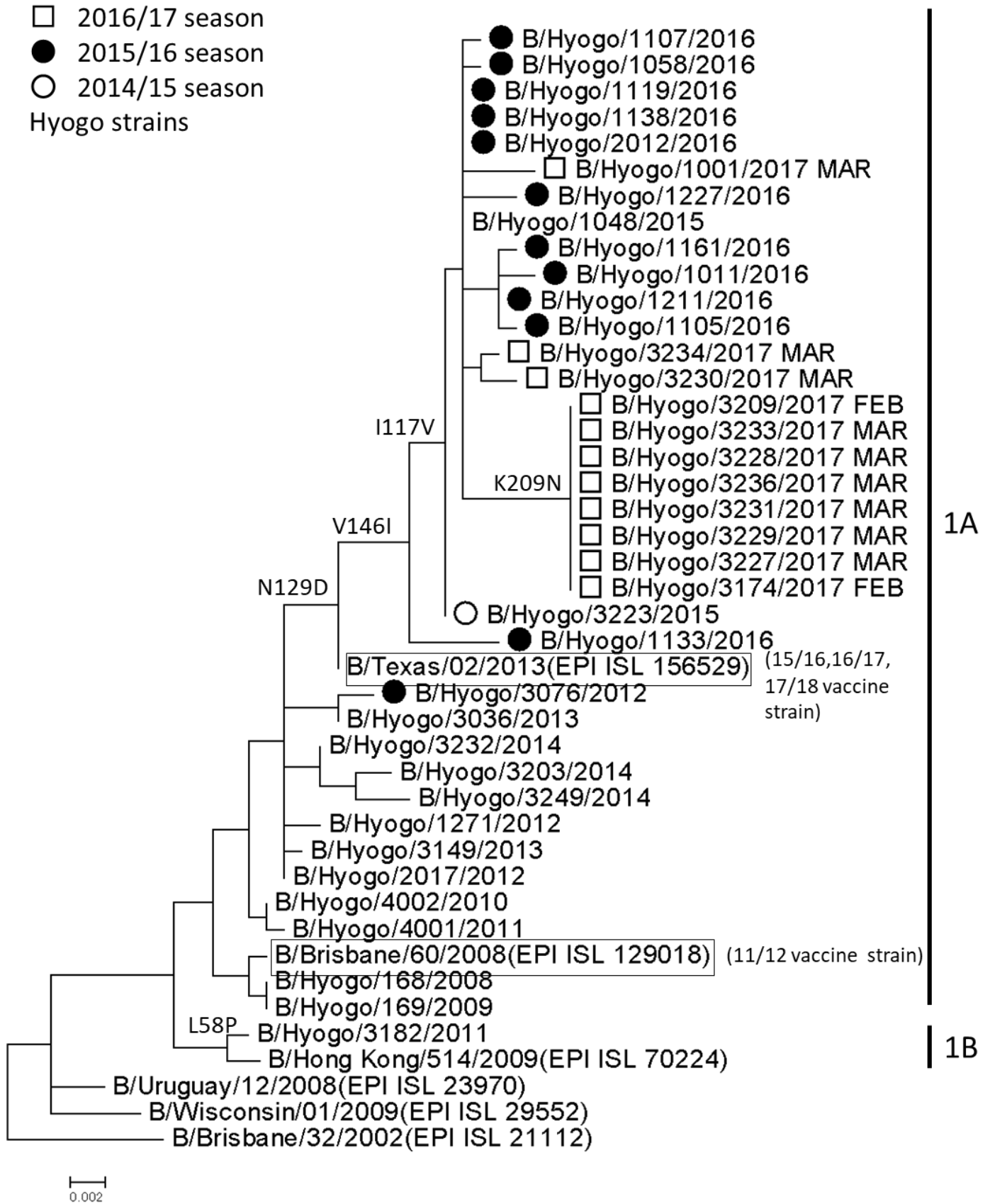


Fig. 6 Phylogenetic analysis of influenza B (Victoria-lineage) HA genes (HA1)

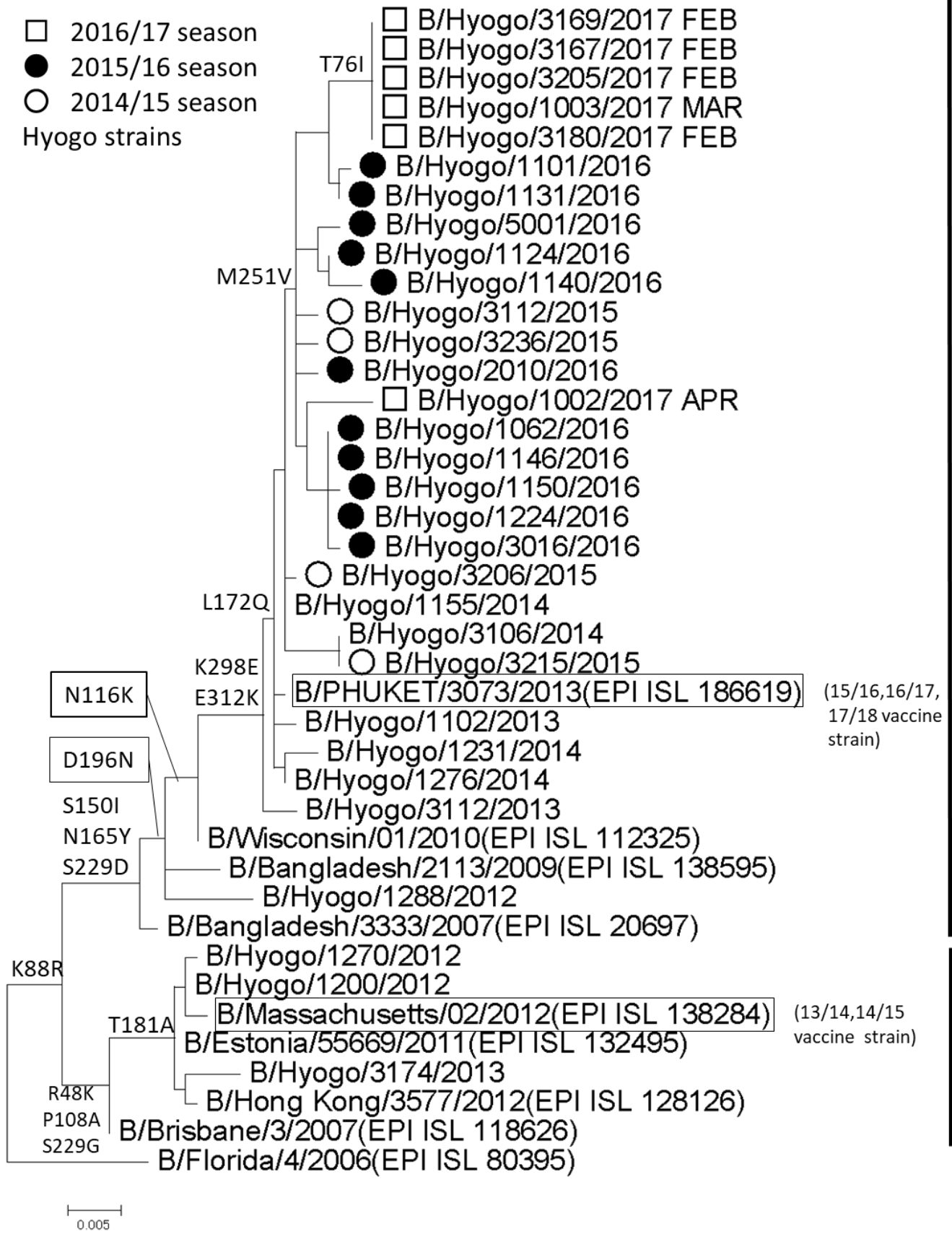


Fig. 7 Phylogenetic analysis of influenza B (Yamagata-lineage) HA genes (HA1)

これらの結果から、流行の開始からピークにかけて AH3 型がほぼ単独で流行し、警報水準を下回った第 6 週以降は、AH3 型に加えて B 型 (Victoria 系統), B 型 (Yamagata 系統), AH1pdm09 が混合流行したものと考えられた。

4. 県内分離ウイルス株の遺伝子解析

AH1pdm09 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。

AH1pdm09 ウイルスはクレード 1~8 に区分され、クレード 6 はさらにサブクレード 6A, 6B, 6C に分類される¹²⁾。2014/15 シーズンの県内株の解析では、D97N, S185T 及び K283E のアミノ酸置換に加えて、K163Q と A256T の置換を持つクレード 6B であった¹⁰⁾。2015/16 シーズンの分離株は、クレード 6B 内に S84N, S162N, I216T 置換を持つクレード 6B.1 と V152T, V173I 置換を持つクレード 6B.2 に分類されており、県内株の 21 株中 16 株 (76%) はクレード 6B.1, 5 株 (24%) はクレード 6B.2 に属した¹¹⁾。本シーズンの県内解析株はすべて 2017/18 シーズンのワクチン株である A/SingaporeGP 1908/2015 と同じクレード 6B.1 に分類された。

国立感染症研究所による本シーズンの国内分離株の解析でもすべての株がクレード 6B.1 となっており¹³⁾、県内分離株と同様の結果であった。ただし、国内分離株の解析で形成された A215G 置換を持つ群は¹³⁾、県内解析株では認められなかった。

AH3 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。

AH3 型ウイルスは、2012/13 シーズン以降クレード 3C が主流となり¹⁴⁾、2013/14 シーズンになるとクレード 3C は A/Texas/50/2012 に代表される 3C.1 と 3C.2, 3C.3 の 3 つのサブクレードに分類された¹⁵⁾。2014/15 シーズン以降、3C.2 は 2016/17, 2017/18 シーズンの 2 期連続で選定されたワクチン株である A/Hong Kong/4801/2014 株に代表される 3C.2a サブグループに分岐し、一方、3C.3 は、2015/16 シーズンのワクチン株である A/Switzerland/9715293/2013 に代表される 3C.3a と 3C.3b サブグループが追加された^{6),12)}。

2014/15 シーズンの県内 AH3 型ウイルス株はすべて 3C.2a 又は 3C.3a サブグループに分類された¹⁰⁾。2015/16 シーズンは 3C.2a サブグループ内に N171K 置換を持つ 3C.2a1 サブクレードが新たに形成され、県内株はすべてサブクレード 3C.2a1 に分類された¹¹⁾。

本シーズンの分離株は解析した 29 株すべてが A/Hong Kong/4801/2014 株と同じ 3C.2a サブグループに属していた。解析した 29 株中 12 株 (41%) が N171K 置換を持つサブクレード 3C.2a1 に属し、この内 R142G, N121K

置換を持つものが 10 株あり、さらに K92R, G142R, H311Q 置換を持つものが 8 株あった。その他にも D53N や N31S 置換を持つ株が 1 株ずつあった。

解析した 29 株中 15 株 (52%) が T131K, R142K の置換を持ち、この内の 13 株は R216Q 置換を持っていた。また、残りの 2 株 (7%) は N31S, D53N, R142G, S144R, N171K, I192T, Q197H の置換を持っていた。

全国の調査でも解析したすべての株がサブグループ 3C.2a に属しており、この内の 66.7% はサブクレード 3C.2a1 であり、その他、T131K, R142K 置換の群, N121, S144K 置換の群及び N31S, D53N, R142G, S144R, N171K, I192T, Q197H 置換の群の 4 群に分類された¹³⁾。県内の結果と比較するとサブクレード 3C.2a1, T131K, R142K 置換の群及び N31S, D53N, R142G, S144R, N171K, I192T, Q197H の置換の群は県内株でも確認されたが、N121K, S144K 置換の群に属する株は認められなかった。

本シーズンの県内株の遺伝子解析によると、3C.2a サブグループ内に少なくとも 3 群に分類されたことやこれらの群内で 7 つのアミノ酸置換を有する群も少数ながら確認されたことから、ウイルス遺伝子の多様化が進んでいることが判明した。

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、B/Brisbane/60/2008 株に代表されるサブクレード 1A と L58P 置換を持つサブクレード 1B に分類される¹⁴⁾。2014/15 シーズンの県内分離株は V146I を持つサブクレード 1A であり^{10),11)}、2015/16 シーズンの解析株も同様に V146I を持つサブクレード 1A に属した¹¹⁾。

本シーズンの解析株 11 株は、すべて 2015/16 から 2017/18 シーズンの 3 期連続でワクチン株となった B/Texas/02/2013 株と同じサブクレード 1A に属しており、V146I, I117V のアミノ酸置換を有していた。この内の 8 株はさらに K209N 置換を持ち、HA1 の解析領域の塩基配列が一致したことから、これらは同一株と考えられ、この株が 3 月頃を中心に県内で流行していたと思われる。

全国の調査では、本シーズンの分離株はすべてサブクレード 1A に属し、N129D, V146I, I117V のアミノ酸置換を伴っており¹³⁾、我々の結果と一致した。

また、2016 年以降にアメリカ合衆国で少数分離されている HA タンパクの 162 番目及び 163 番目のアミノ酸欠損株は⁵⁾、分離されなかった。

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 及び S229G のアミノ酸置換が特徴のクレード 2 と S150I, N165Y 及び S229D のアミノ酸置換を持つクレード 3 に区分される¹⁴⁾。2013/14 シーズンの県内分離株はクレード 2 と 3 が混在したが⁹⁾、2014/15 シーズンは、すべて L172Q 置換を持つクレード 3 に分類され¹⁰⁾、2015/16 シーズンは L172Q, M251V 置換を持つクレード 3 に属した。

本シーズンの分離株を解析した結果、前シーズンと同様にすべて L172Q, M251V 置換を持ち、2015/16 から 3 期連続でワクチン株となった B/Phuket/3073/2013 株と同じクレード 3 に属していた。この内の 5 株が T76I 置換を持ち、HA1 領域の配列が一致したことから同一株と考えられ、2 月を中心に県内で流行したものと思われた。

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¹³⁾、県内と同様の結果であった。また、2016 年以降にバングラデシュやサウジアラビア等の一部地域で分離されている Victoria 系統の NA 遺伝子に入れ替わったリアソータント株は⁹⁾、我々が解析した株には含まれていなかった。

5. 抗インフルエンザ薬剤耐性株の検出

AH1pdm09 ウイルス株 7 株について、Real-Time RT-PCR 法により抗インフルエンザ薬剤耐性株を調査した結果、H275Y 置換を有する耐性株は検出されなかった。2007/8 シーズンにオセルタミビル耐性を持つ A ソ連型 (AH1 型) インフルエンザウイルス株が急増した事例もあることから、今後も検出動向を注視する必要がある。

IV 結 論

兵庫県における 2016/17 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 番目に小さい規模となり、主に AH3 型が 80% を占め、B 型 (Victoria 系統)、B 型 (Yamagata 系統) 及び AH1pdm09 ウイルスが検出された。

遺伝子系統樹解析の結果、AH1pdm09 ウイルスはクレード 6B.1 に属し、AH3 型ウイルスはすべて 2016/17、2017/18 シーズンの 2 期連続で選定されたワクチン株である A/Hong Kong/4801/2014 株と同じ 3C.2a クレードに属した。B 型 (Victoria 系統) はワクチン株と同じサブクレード 1A に属し、B 型 (Yamagata 系統) の分離株についてもワクチン株と同じくクレード 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、県下の健康福祉事務所並びに指定提出機関に深謝致します。

文 献

- 1) 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)
- 2) 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センター紀要, **4**, 54-57 (2007)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) WHO influenza centre The Francis Crick Institute London : Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2017-2018 27th February – 01st March 2017 : https://www.crick.ac.uk/media/358671/crick_nh_vcm_report_feb_2017_v2.pdf (accessed 2017-10-2)
- 6) 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**, 第 11 号, 211-221 (2016)
- 7) 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 (2016-2017 シーズン) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-m/590-idsc/7323-fludoko-2016.html> (accessed 2017-10-2)
- 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 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)
- 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 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)

- 11) 押部智宏, 萩美貴, 高井伝仕, 近平雅嗣ほか: 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, **8**, 7-15 (2017)
- 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), **36**, 第11号, 199-207 (2015)
- 13) 国立感染症研究所: インフルエンザウイルス流行株

抗原性解析と遺伝子系統樹 2017年6月26日

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-m/flutoppage/2382-flu/flu-antigen-phylogeny/7345-2017-2-25.html> (accessed 2017-10-2)

- 14) 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), **34**, 第 11 号, 325-339 (2013)
- 15) 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**, 第 11 号, 251-258 (2014)

(平成 29 年 12 月 6 日受理)