

[ノート]

## 兵庫県における 2018/19 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 秋山 由美

## Characteristic Analysis of the Seasonal Influenza Viruses in Hyogo Prefecture, Japan, during the 2018/19 Season

Tomohiro OSHIBE\*, Miki OGI, Denshi TAKAI, Masatsugu CHIKAHIRA and Yumi AKIYAMA

*Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Sciences 1819-14, Kanno Kanno-cho, Kakogawa-city, 675-0003, Japan*

Influenza activity during the 2018/19 influenza season was the fourth highest in the last 5 seasons in Hyogo prefecture, Japan. The AH3 subtype (55%) predominated over AH1pdm09 (37%) and B (Victoria lineages) (8%) viruses.

The HA genes of AH1pdm09 viruses fell into the genetic subgroups 6B.1A. The HA genes of AH3 viruses fell into the phylogenetic subclade 3C.2a1b with substitution T131K.

All B (Victoria lineage) viruses belonged to the genetic group 1A, many of which were a three amino acid deletion ( $\Delta$ 162-164) with G133R, K136E substitutions in the HA genes.

## I はじめに

インフルエンザは、毎年冬季を中心に流行する急性熱性感染症である。この原因とな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の3型に分類され、A型やB型はそれぞれ亜型や系統に細分される。このうち近年、流行を引き起こしているウイルスは、A型ではAH1pdm09とA香港型（以下AH3型）、B型はYamagata系統及びVictoria系統である。これらのウイルスは少しずつ変異を繰り返しながら宿主の免疫から逃れたり、薬剤耐性を獲得したりすることから、流行するウイルスのタイプ、遺伝子変異、抗原性等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2018/19シーズンに実施した調査結果について報告する。

## II 材料と方法

## 1. 検体

2018/19 シーズン（2018 年第 35 週から 2019 年第 34 週）に県内の指定提出機関（21 か所）で採取された咽頭又は鼻腔ぬぐい液 244 検体及び小学校等の施設における集団感染事例、重症例等から採取された 3 検体の合計 247 検体を用いた。

## 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<sup>1)</sup>。

感染症部

\*別刷請求先：

〒675-0003 加古川市神野町神野 1819-14

兵庫県立健康科学研究所 感染症部 押部 智宏

### 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<sup>2)</sup>, 咽頭ぬぐい液を MDCK 細胞に接種し, トリプシン添加培地で 5%CO<sub>2</sub>, 33°C, 7 日間培養した. 細胞変性効果 (CPE) がみられた細胞の培養上清は, 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<sup>3,4)</sup>.

### 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<sup>3,4)</sup>. 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/Singapore/GP1908/2015 (H1pdm09), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3), B/Maryland/15/2016 (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 法で増幅したヘマグルチニン (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, Maximum Likelihood 法により系統樹解析を行った. また, 一部の株については HA 遺伝子領域すべての塩基配列を決定した. 解析に用いる代表株やクレード, サブクレード等の名称は, The Francis Crick Institute Worldwide Influenza Centre (WIC) 又は国立感染症研究所の報告に基づいた<sup>5,6)</sup>. 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™) を引用し, 株名の横に EpiFlu™ の Isolate ID を示した (Fig.4-7).

### 6. 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, ノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤 (オセルタミビル・ペラミビル) 耐性の指標となる NA タンパクの H275Y 変異株を検出した<sup>1)</sup>. また, キャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害剤 (バロキサビル) 耐性の指標となる RNA ポリメラーゼ  $\alpha$  サブユニット (PA) タンパクの I38T/F/M 変異について, 国立感染症研究所が示したダイレクトシーケンス法により検出した<sup>1)</sup>.

## III 結果及び考察

### 1. 県内のインフルエンザの流行状況

2016/17 シーズンから本シーズンまでの感染症発生动

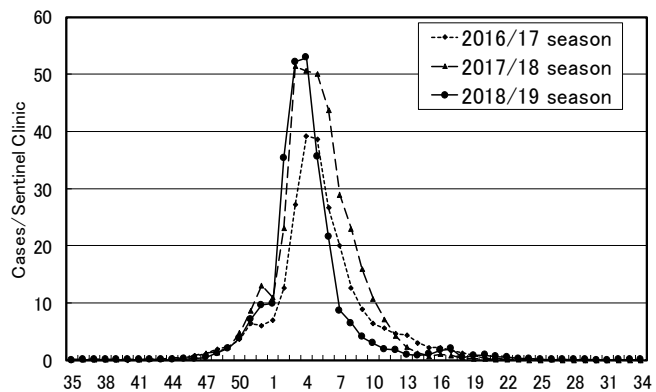


Fig.1 Weekly cases of influenza-like illness per sentinel clinic from 2016/17 season to 2018/19 season in Hyogo prefecture, Japan

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, 全国より 1 週早い 2018 年第 48 週に流行開始の指標となる 1.0 人を超え<sup>6)</sup>, 2017/18 シーズンより 1 週早い流行となった<sup>7)</sup>. その後急速に増加し 2019 年第 2 週に警報水準とされる定点あたり 30 人を超え, 第 4 週にピークを迎えた. ピーク時の患者数は 52.9 人で, 過去 5 シーズンで最高となった. 第 4 週以降は減少に転じ, 第 6 週には 28.9 人と警報水準を下回った. 警報水準の持続期間は 2017/18 シーズンと同じく 4 週間であった<sup>7)</sup>. これ以降も徐々に減少を続けて第 12 週まで 17 週間流行が持続した. その後, 第 15 週から第 17 週にかけて再び 1.0 人を上回った後に終息した.

本シーズンの流行期間 (再流行期間を除く) の累積患者報告数は 51,100 人と過去 5 シーズンで 4 番目の規模となった.

### 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.

指検査対象の 247 検体のうち 235 検体 (95%) から 236 件のインフルエンザウイルスが検出された. 内訳は, AH3 型が 131 件 (55%), AH1pdm09 が 87 件 (37%), B 型 (Victoria 系統) が 18 件 (8%) であった.

本シーズンは前シーズンに最も多く検出された B 型 (Yamagata 系統) が検出されず<sup>7)</sup>, B 型 (Victoria 系統) の検出も少なかったため, B 型の検出割合は過去 5 シーズンで最も低かった.

各亜型 (系統) の検出状況を過去のシーズンと比較すると, A 型は 2016/17 シーズン以降連続して AH3 型が優

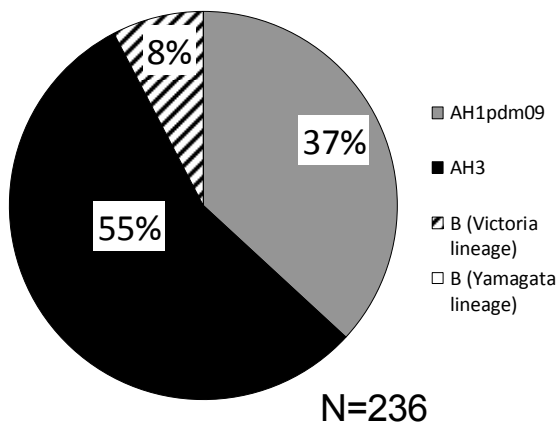


Fig.2 Proportion of isolation/detection of influenza virus during 2018/19 season in Hyogo prefecture, Japan

勢となり<sup>7,8)</sup>、一方、B型は2016/17シーズンがVictoria系統<sup>8)</sup>、2017/18シーズンはYamagata系統<sup>7)</sup>、本シーズンはVictoria系統が優勢となり、両者が交互に主流となった。

指定提出機関（医療機関）で行ったインフルエンザの簡易検査でA、B型が共に陽性と判定された1検体についてReal-Time RT-PCR法により調べたところ、AH1pdm09とB型（Victoria系統）が重複して検出された。簡易検査ではA、B型が共に陽性となった場合は偽陽性と判定されることがあるが、前シーズンにReal-Time RT-PCR法で重複検出が確認された今回と同様の例が2例見られたことから<sup>7)</sup>、稀ではあるものの重複感染も十分考慮する必要があると考えられた。

### 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、第36週にAH3型が初めて検出された。流行開始前の第47週までにAH3型が3件、AH1pdm09が2件検出された。

流行開始の第48週から警報水準に達する前の第1週までの期間はAH1pdm09が38件、AH3型が17件でAH1pdm09が多く検出された。

警報水準が持続した第2週から第5週までの流行ピークの期間は、AH3型が64件、AH1pdm09が35件、B型（Victoria系統）1件であり、AH3型がAH1pdm09より多く検出された。

警報水準を下回った第6週から流行が持続した第12週までの期間は、AH3型が38件、AH1pdm09が11件でAH3型が多く検出され、B型（Victoria系統）が5件検出された。

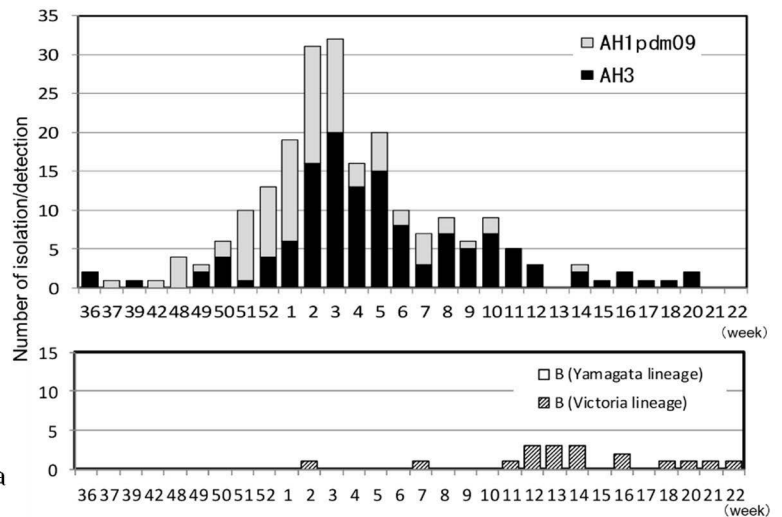


Fig.3 Weekly isolation/detection of influenza virus during 2018/19 season in Hyogo prefecture, Japan

流行終息後の第13週から第22週までの期間は、B型（Victoria系統）が12件、AH3型が9件、AH1pdm09が1件であり、B型が最も多く検出された。

これらのことから本シーズンは、すべての流行期間を通じてA型が主体となりAH1pdm09、AH3型の2つの亜型が混合流行していたことが明らかとなった。さらに、流行開始から警報水準に到達するまでの流行の初期ではAH1pdm09が主体となったものの、警報水準が持続したピーク期とそれ以降の終息までの後期はAH3型が主流となったものと考えられた。

本シーズンは患者数が過去5シーズンで最も高いピークを示したが、これはAH1pdm09とAH3型が混合して流行したことがピークを押し上げた要因と考えられた。

また、例年、流行の開始からピークにかけてはA型が主体となり、ピーク後の後半は徐々にB型が主流となる傾向が認められるが、本シーズンはB型の流行が小規模であったため、流行ピーク後に急激な減少がみられたものと考えられた。

B型の流行が小規模であった理由としては、本シーズンの流行株の抗原性が前シーズンと類似していること<sup>6)</sup>や前シーズンにB型（Yamagata系統）による比較的大きな流行があり<sup>7)</sup>、B型ウイルスに対する免疫を獲得した人が多かったことが考えられた。

### 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。2016/17シーズンの県内株は、2017/18及び2018/19シーズンのワクチン株であるA/Singapore/GP1908/2015と

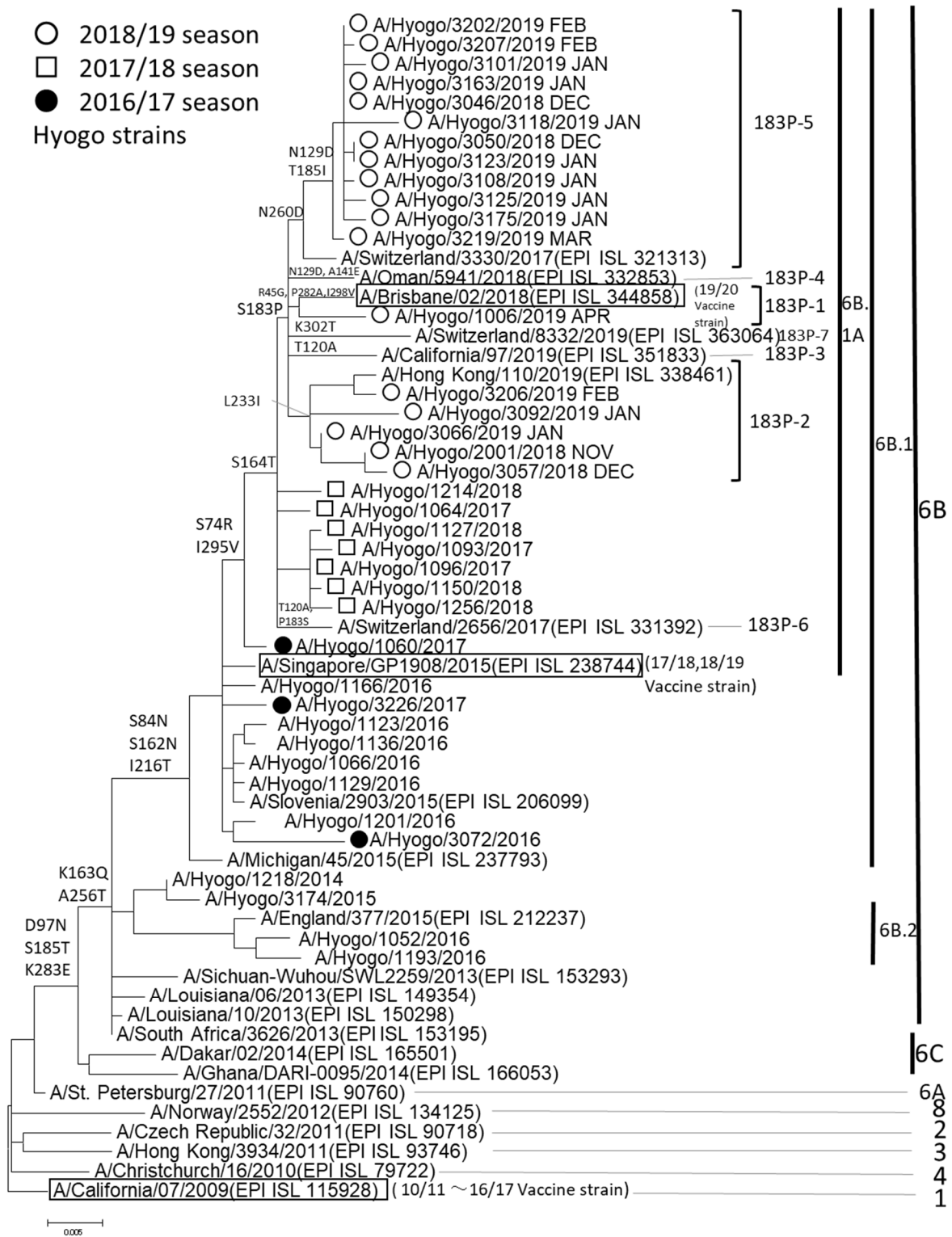


Fig.4 Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1)pdm09 HA genes (HA1)

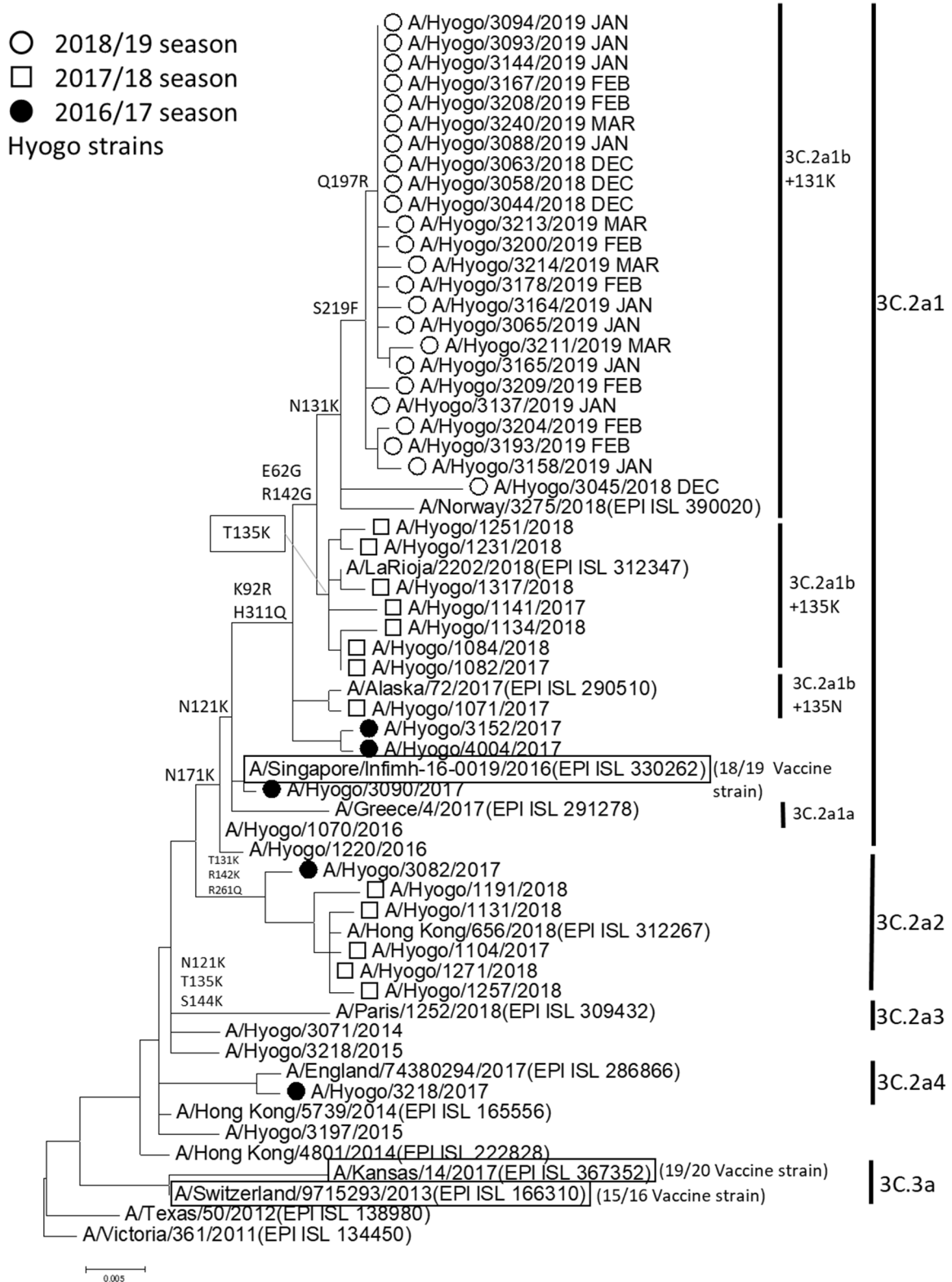


Fig.5 Phylogenetic analysis of influenza AH3 HA genes (HA1)

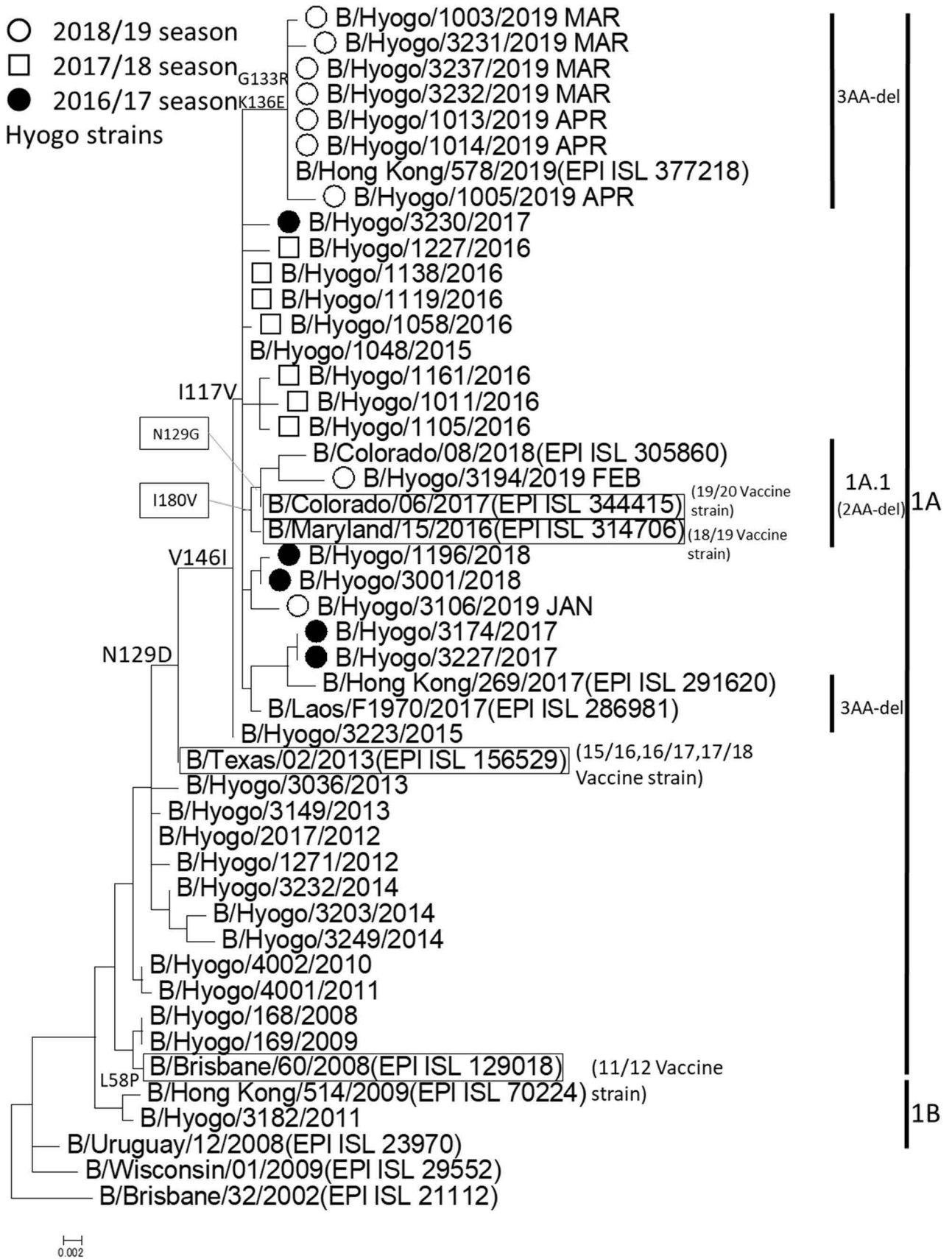


Fig.6 Phylogenetic analysis of influenza B (Victoria-lineage) HA genes (HA1)

同じクレード 6B.1 に分類され<sup>8)</sup>, 2017/18 シーズンはクレード 6B.1 内の 6B.1A (S74R, S164T, I295V) のサブクレードに分類された<sup>7)</sup>. 6B.1A はさらに S183P を有する 7 つのグループに分類されるが<sup>9)</sup>, 解析した 18 株のうち 12 株 (67%) は N260D を持つ 183P-5, 5 株 (28%) は L233I を持つ 183P-2, 1 株 (6%) は 2019/20 シーズンのワクチン株である A/Brisbane/02/2018 と同様に N451T を持つ 183P-1 に分類された.

国立感染症研究所による国内分離株の解析では, 多い順に 183P-5 が 54.8%, 183P-2 が 21.6%, 183P-7 が 8.7% となっており<sup>9)</sup>, 上位 2 グループが多くを占めた県内の解析結果も同様の傾向を示していた.

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.

近年の AH3 型ウイルスは, 3C.2a 及び 3C.3a クレードに分類され, 3C.2a はさらに 3C.2a 1~4 に分けられ, このうち 3C.2a 1 はさらに 3C.2a 1a, b に分岐している<sup>5),6)</sup>.

2016/17 シーズンの県内株は, クレード 3C.2a1, 3C.2a2, 3C.2a4 に属しており<sup>8)</sup>, 17/18 シーズンの県内株は, サブクレード 3C.2a1b と 3C.2a2 に分類され, 3C.2a1b の株は T135K 又は T135N を持ついずれかのグループに属した<sup>7)</sup>.

サブクレード 3C.2a1b では, 新たに T131K を持つグループが形成されているが<sup>9)</sup>, 本シーズンに解析した 24 株はすべてこのグループに属した. このうちの 18 株 (75%) はさらに Q197R のアミノ酸置換を持っていた.

全国の調査では, 多い順に, サブクレード 3C.2a1b で 131K 置換を持つグループが 82.1%, T135K 置換を持つグループが 7.1%, 3C.2a2 が 10.5% となっており<sup>9)</sup>, サブクレード 3C.2a1b で 131K 置換を持つグループが多くを占めた県内の結果と同様であることが分かった.

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 株に代表されるクレード 1A と L58P 置換を持つクレード 1B に分類され, さらに 2018/19 シーズンのワクチン株である B/Maryland/15/2016 に代表される I180V, R498K の置換を持ち 2 アミノ酸欠損 (162, 163) がある 1A.1 サブクレードに分類される<sup>9)</sup>.

2016/17 及び 2017/18 シーズンの県内株は N129D, V146I, I117V を持つサブクレード 1A に属した<sup>7),8)</sup>.

本シーズンに解析した県内分離の 9 株は, 2015/16 シーズン以降の県内株と同様に N129D, V146I, I117V を持つサブクレード 1A に属した. このうちの 7 株は G133R, K136E を持つ 3 アミノ酸欠損株 (162-164) に分類され, 1 株はサブクレード 1A.1 に属し, 1 株はアミノ

酸欠損のないサブクレード 1A に属する株であった.

全国の調査では, 多い順に, G133R, K136E を持つ 3 アミノ酸欠損株が 74.0%, サブクレード 1A.1 が 15.7%, クレード 1A が 7.1% となっており<sup>9)</sup>, G133R, K136E を持つ 3 アミノ酸欠損株が優勢だった県内の結果と同様であった.

## 5. 抗インフルエンザ薬剤耐性株の検出

AH1pdm09 ウイルス株 21 株について, Real-Time RT-PCR 法によりオセルタミビル・ペラミビル耐性株を調査した結果, NA タンパクに H275Y 置換を有する耐性株は検出されなかった.

また, 临床上, バロキサビル耐性ウイルスの感染が疑われ患者の 1 検体について調べたところ, PA タンパクに I38T/F/M 置換を有する耐性株は検出されなかった.

全国の調査ではオセルタミビル・ペラミビル耐性株が 1.0%, バロキサビル耐性は AH1pdm09 が 1.8%, AH3 型が 9.6% 検出されていることから<sup>9)</sup>, 引き続きこれらの耐性株の動向を監視していく必要があると思われる.

## IV 結 論

兵庫県における 2018/19 シーズンのインフルエンザの流行は過去 5 シーズンで 4 番目の規模となり, 検出されたウイルスは, AH3 型が 55%, AH1pdm09 が 37%, B 型 (Victoria 系統) が 8% となった.

遺伝子系統樹解析の結果, AH1pdm09 ウイルスはクレード 6B.1A に属し, AH3 型ウイルスは 131K のアミノ酸置換を有するサブクレード 3C.2a1b に属した. B 型 (Victoria 系統) はすべてクレード 1A に属し, その多くは G133R, K136E を持つ 3 アミノ酸欠損株であった.

## 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ならびに指定提出機関の皆様方に深謝致します.

## 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4版) (2019)
- 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 vaccines for the Southern Hemisphere 2020 23rd-26th September 2019
- 6) <https://www.crick.ac.uk/partnerships/worldwide-influenza-centre/annual-and-interim-reports> (accessed 2019-12-25)
- 7) 国立感染症研究所感染症疫学センター : 病原微生物検出情報 (IASR), **40**, 177-190 (2019)
- 8) 押部智宏, 萩美貴, 高井伝仕, 近平雅嗣ほか : 兵庫県における 2017/18 シーズンのインフルエンザウイルス分離株の性状解析. 兵庫県立健康科学研究所研究報告, **1**, 7-16 (2019)
- 9) 押部智宏, 榎本美貴, 高井伝仕ほか : 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, **9**, 1-10 (2018)  
(令和2年2月28日受理)