

2013/2014～2017/2018 シーズンに栃木県において分離された インフルエンザウイルスの解析について

微生物部

榎渕 泉美¹ 水越 文徳 桐谷 礼子
(¹ 現県東健康福祉センター)

1 はじめに

インフルエンザは日本において毎年冬季に流行しているが、流行開始時期や流行の程度、流行株は毎年変化している。栃木県保健環境センターでは、感染症発生動向調査事業に基づき、栃木県内（宇都宮市を除く）のインフルエンザ定点からインフルエンザ患者検体を収集し、検査・解析を行っている。今回、過去5シーズン（2013/2014～2017/2018 シーズン）に当センターで検出されたインフルエンザウイルスについて解析したので、その概要を報告する。

2 材料と方法

2.1 材料

調査期間は2013/2014 シーズンから2017/2018 シーズンを対象とした。インフルエンザは冬季に流行することから、第35週から翌年第34週、もしくは9月から翌年8月を1シーズンとした。発生動向調査事業により搬入されたインフルエンザ及びインフルエンザ様疾患検体と、集団発生事例で搬入された行政検査の咽頭ぬぐい液、等の789検体を対象とした。

2.2 インフルエンザ患者発生状況

県内のインフルエンザ定点からの患者報告数については、栃木県感染症情報センターの情報を取得して解析を行った¹⁾。

2.3 インフルエンザウイルスの検出、分離と薬剤耐性マーカーの検出

インフルエンザウイルスの検出、型及び亜型の決定はリアルタイム RT-PCR 法で実施した²⁾。また、MDCK 細胞を用いてウイルス分離を行い、継代3代目まで細胞変性効果を確認した。分離されたインフルエンザウイルスのうち AH1pdm09 亜型については、Allele-specific リアルタイム PCR 法を用いた薬剤耐性マーカー (H275Y) の検出を行った²⁾。

2.4 赤血球凝集阻止試験

インフルエンザウイルスが分離された検体506株を対象に、赤血球凝集素 (HA) 試験を実施した²⁾。HA 試験により HA 価が8以上得られた392株について、赤血球凝集阻止 (HI) 試験を実施した²⁾。

2.5 分子疫学的解析

分離又は検出されたインフルエンザウイルスの AH3

亜型8株、AH1pdm09 亜型7株を対象に、HA 遺伝子のPCR産物を用いたダイレクトシーケンシング法により塩基配列全長を解読した²⁾。クレード分類は、得られた塩基配列をアミノ酸に変換して、変異を確認して決定した^{3), 4), 5), 6), 7)}。得られた塩基配列を基に MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 7 を用いて最尤法 (Maximum likelihood method; ML 法) による系統樹を構築した⁸⁾。系統樹に用いる参照株の塩基配列については、Influenza Virus Resource から日本で同シーズンに検出・分離された株のデータを取得した⁹⁾。

3 結果

3.1 患者発生状況

県内の定点あたりのインフルエンザ患者報告数を図1に示した。患者数のピークは毎シーズン第4週から第6週の間のみられた。定点あたりの報告数が1.0人/週を超えることが流行開始の指標であるが、流行入りはシーズンごとに異なり、最も早いのは2016/2017 シーズン(第44週)、最も遅いのは2015/2016 シーズン(第1週)であった。流行の規模は、2013/2014 シーズンから2016/2017 シーズンまで同程度であったが、2017/2018 シーズンは過去5シーズンで最も大きな流行を示した。

3.2 インフルエンザウイルス検出状況

リアルタイム RT-PCR 法で検出されたインフルエンザウイルスについてシーズンごとの検出数を図2に示した。

2013/2014 シーズンは、流行初期は AH3 亜型が多く検出され、ピーク時は、AH1pdm09 亜型も多数検出された。流行後期は、B 型山形系統が増加し、シーズンを通して3つ亜型・系統が同数程度検出された。

2014/2015 シーズンは、シーズンを通して AH3 亜型が主流株となり、AH1pdm09 亜型は検出されなかった。シーズン後半には B 型山形系統も検出された。

2015/2016 シーズンは、流行開始前には AH3 亜型が検出されたが、流行期に入って一気に検体数が増加し、AH1pdm09 亜型が主流株となった。同時に B 型も多数検出され、ピーク時はビクトリア系統、流行後期は山形系統が検出された。B 型は山形系統とビクトリア系統が同数程度検出された。

2016/2017 シーズンは流行初期からシーズンを通して AH3 亜型が主流株であった。B 型は、ピーク時はビクトリ

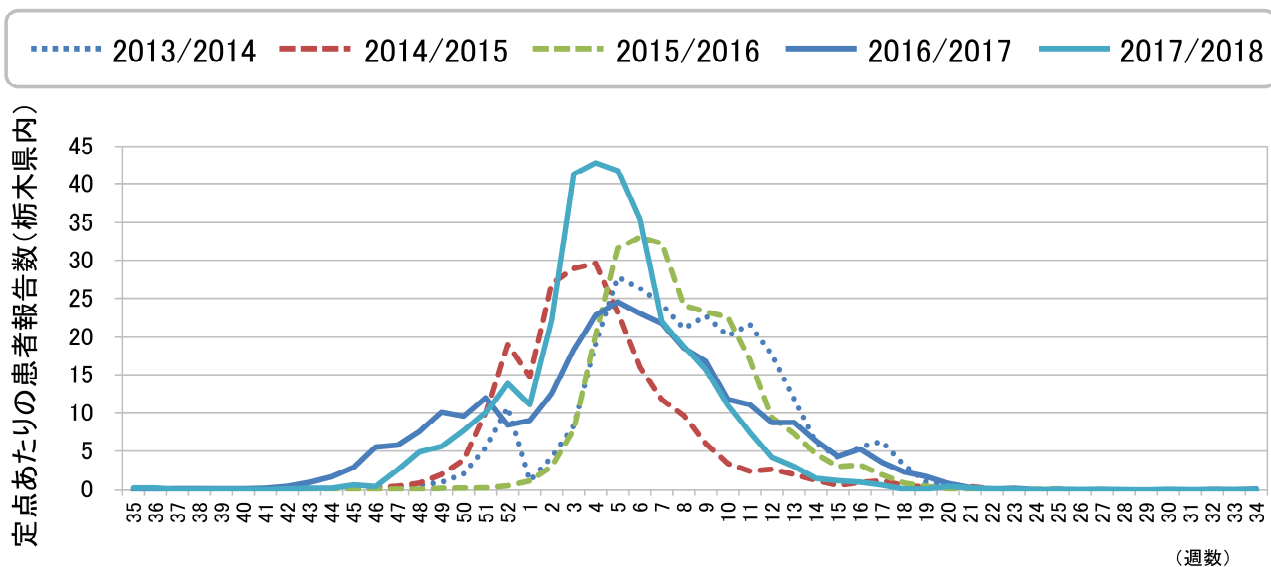


図1 栃木県内の各シーズンにおけるインフルエンザ患者報告数

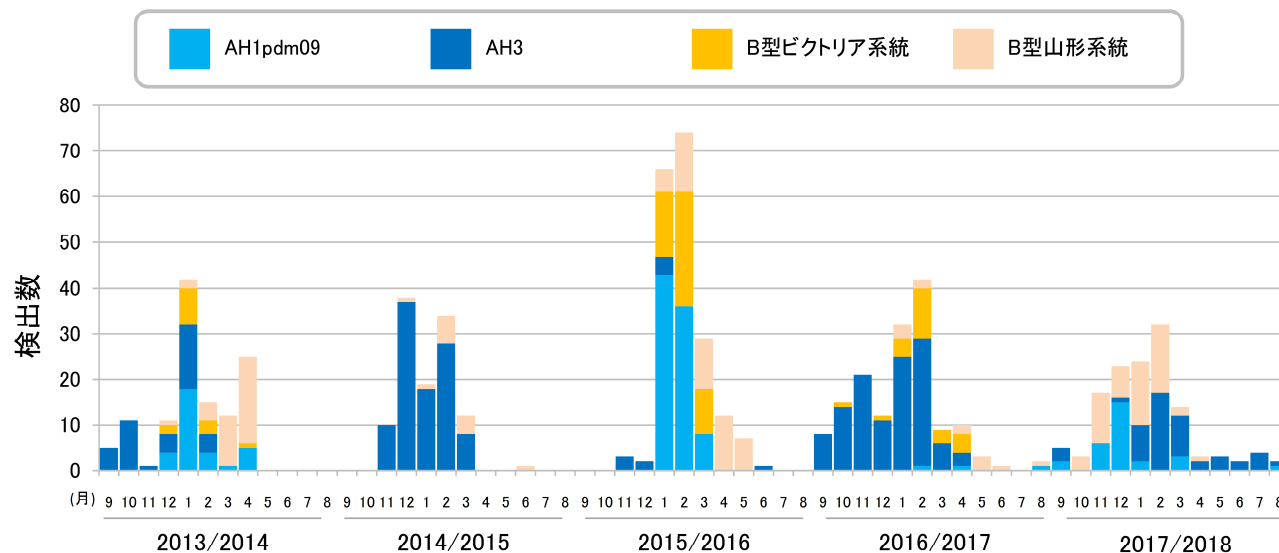


図2 栃木県内の各シーズンにおけるインフルエンザウイルス検出数

ア系統が検出され、流行後期は山形系統も数件検出された。

AH3 亜型は隔シーズン（2014/2015、2016/2017）ごとに主流株となり、当該シーズンには AH1pdm09 亜型や B 型はあまり検出されなかった。対して、B 型は隔シーズン（2013/2014、2015/2016、2017/2018）ごとに流行を繰り返し、流行後期にかけて増加する傾向が確認された。

3.3 H275Y 変異の検出

薬剤耐性マーカーとして、オセルタミビル及びペラミビルに対して耐性を示す NA 蛋白質の 275 番目のアミノ酸変異（ヒスチジンからチロシンに変異）の検出を実施した。分離された 80 株の AH1pdm09 を検査した結果、2 株から H275Y 薬剤耐性マーカーを検出した。いずれも

2015/2016 シーズンの検体で、検出率は 2.5%（51 株中 2 株）だった。全国の同シーズン中に検出された AH1pdm09 のうち、H275Y 耐性変異を持つオセルタミビル・ペラミビル耐性株は 1.9%（2565 株中 48 株）だった⁵⁾。

3.4 分子疫学解析

AH1pdm09 亜型分離株の HA 遺伝子領域の系統樹を示した(図 3)。解析した株は、2013/2014 シーズン株は 6B.2 に、2015/2016 シーズン以降は全て 6B.1 に属した。

AH3 亜型分離株の HA 遺伝子領域の系統樹を示した(図 4)。2013/2014 シーズンは 3C.3 に、2014/2015 シーズン以降は全て 3C.2a に属した。全国的にも 2014/2015 シー

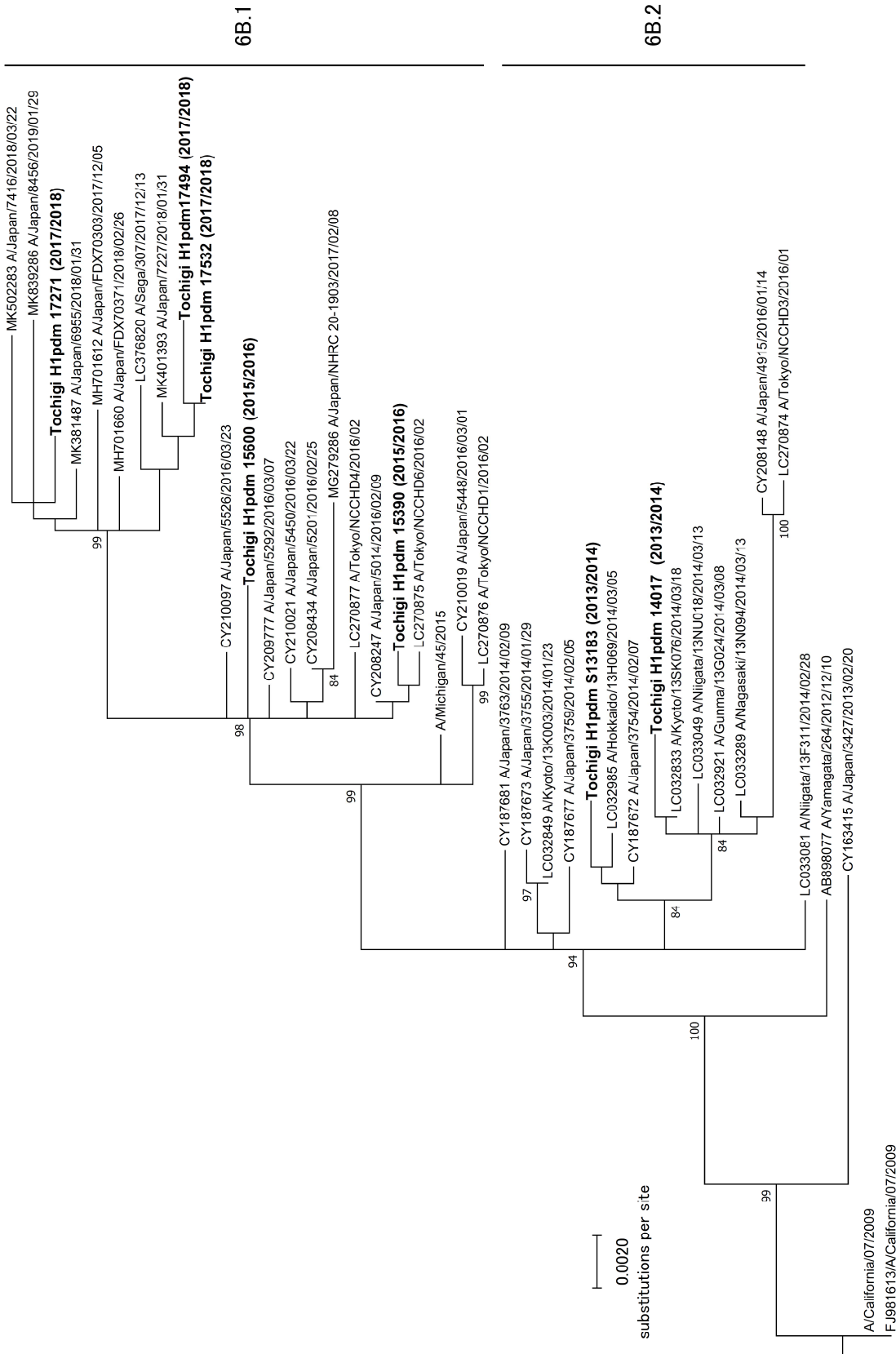


図3 AH1pdm09 亜型の HA 遺伝子 (partial: 1611 nucleotides) の ML 系統樹
 [HKY model +G, >80% bootstrap; 1000 bootstrap iterations, bold; isolates in this study]

3C.2a

3C.3

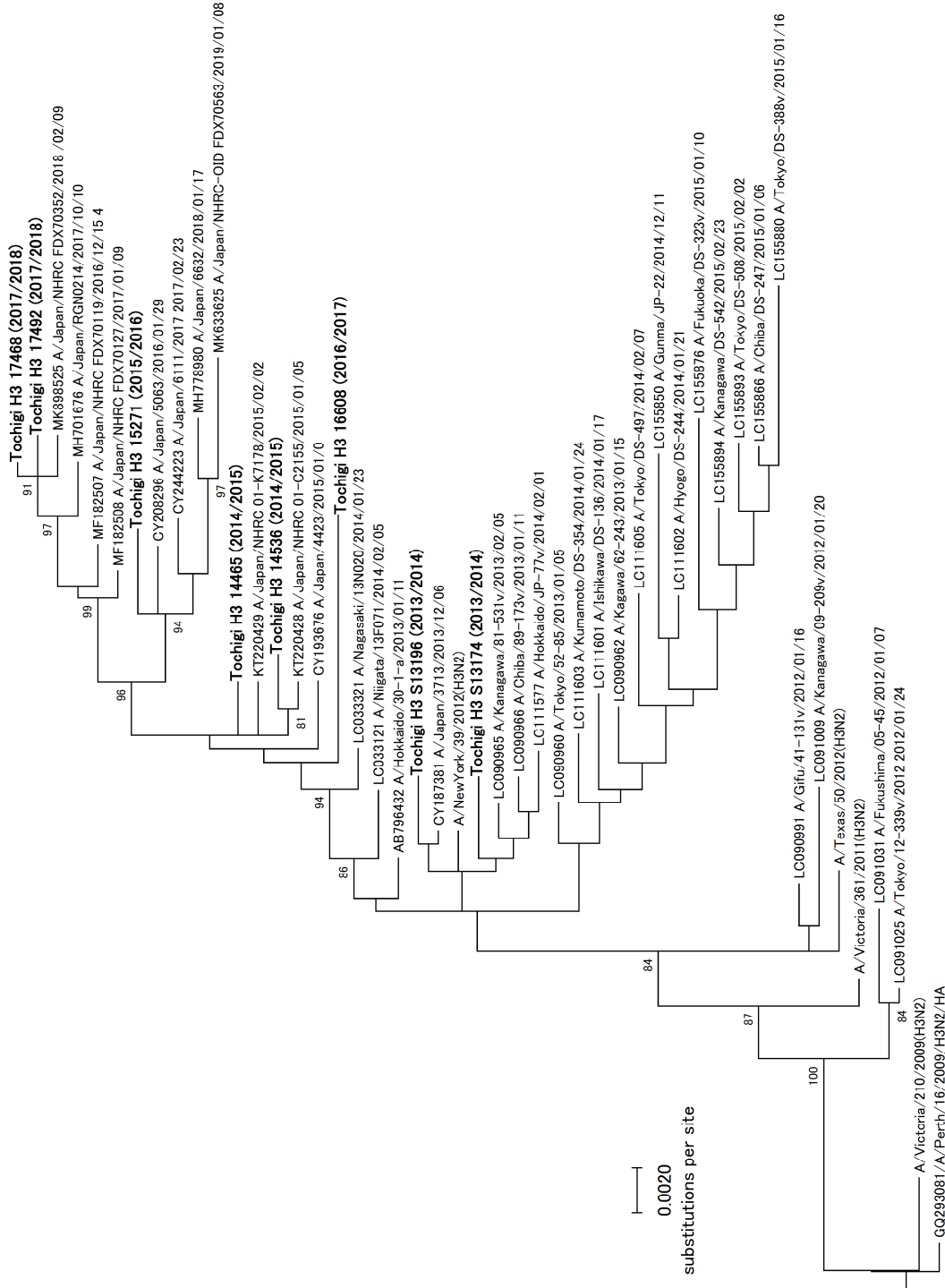


図4 AH3 亜型の HA 遺伝子 (complete; 1701 nucleotides) の ML 系統樹
 [GTR model +G+I, >80% bootstrap; 1000 bootstrap iterations, bold; isolates in this study]

表1 各シーズンにおけるHI 価/ホモ価

	シーズン	HI 価/ホモ価						小計
		≥4	2	1	1/2	1/4	1/8	
AH1pdm09 亜型	2013/2014			3	1			4
	2014/2015							0
	2015/2016	20	18	11				49
	2016/2017	1	1					2
	2017/2018	24	2		1			27
AH3 亜型	2013/2014				1			1
	2014/2015					9	16	28
	2015/2016				1	1		2
	2016/2017				2	9	12	30
	2017/2018				1	1	3	1
B 型ビクトリア系統	2013/2014	1						1
	2014/2015							0
	2015/2016	22	18					40
	2016/2017	14	6					20
	2017/2018							0
B 型山形系統	2013/2014	3	7	1	6	6		23
	2014/2015	2	4	4	1			11
	2015/2016	1	7	23	13			44
	2016/2017	6	4		1			11
	2017/2018	37	11	3				51

ズンから3C. 2aが増加していた¹⁰⁾。3C. 2aに属する株は、HA 活性が極めて低いためHI 試験が困難で、全国の地研で抗原性解析が難しく、課題となっている¹¹⁾。

3.5 抗原性解析

分離された株とシーズンごとのワクチン株抗血清との反応性について示した(表1)。HI 試験で得られたホモのHI 価に対する分離株のHI 価が1/8以下の低下を認めた株が抗原性変異株、1/4以上の株が抗原性類似株となる。過去5シーズンの株を解析した結果、AH1pdm09 亜型、及びB型の両亜型の分離株全ては、いずれのシーズンにおいて抗原性類似株だった。一方、AH3 亜型分離株は、全てのシーズンにおいて抗原性変異株が殆どを占めた。しかしながら、AH3 亜型はHA 活性が低くなる問題から、抗原性の解析を中和試験に代替するなど考慮する必要がある¹¹⁾。

4 考察

過去5シーズンに栃木県内で分離検出されたインフルエンザウイルスは、2016/2017 シーズンまでは、流行の前半はA型、後半はB型が主流株になる傾向が確認されていたが、2017/2018 シーズンは流行初期から同時に複数の型が流行し、患者数の増加に影響した可能性が示唆された。2015/2016 シーズンまでは、非流行期のインフルエンザウイルスの検出はほとんどなく、流行期と非流

行期がはっきりとしていたが、2016/2017 シーズンは非流行期に入っても数件ずつ検出され、そのまま2017/2018 シーズンの流行入りとなった。2017/2018 シーズン後の非流行期にも数件ずつ検出された。2018年4月以降はインフルエンザの指定医療機関を指定するため県内医療機関への検体採取等の周知が行われたことから、インフルエンザ様疾患検体の搬入が増加し、過去シーズンに比べて多く検出された可能性がある。また、気候の変化やグローバル化に伴い、非流行期の北半球に流行期の南半球から持ち込まれ、拡大する等インフルエンザの流行時期が変化していることも考えられた。

2017/18 シーズンは非流行期からAH1pdm09 亜型とAH3 型だけでなく、B 型山形系統も検出された。このB 型山形系統はシーズンを通して検出され、A 型と同時に流行していた。

今回、分子疫学解析を実施した株は、各シーズンに全国で流行した株とほぼ一致しており、全国の流行と同様の傾向が確認された^{3), 4), 5), 6), 7)}。AH3 亜型は、近年、クレードが3C. 3から3C. 2へのシフトが認められていた^{10), 12)}。県内で分離されたAH3 型も2013/2014 シーズンと2014/2015 シーズンを境に主流のクレードに変化が認められた。

県内で分離されたAH3 亜型分離株は抗原性変異株が多い結果であった。現行のワクチンの製造法は、選ばれた

ウイルス株を鶏卵で継代して製造しているため継代の際に、ウイルスが鶏卵に馴化することで抗原性が変化する場合がある¹³⁾。その結果、流行株とワクチン製造株との抗原性が乖離してしまうことが問題となり、今後の課題となっている。

インフルエンザウイルスは遺伝子セグメントの組み換えを起こすため、パンデミックの発生の可能性が常に危惧されている¹⁴⁾。また、遺伝子の変異で抗原性を変化させて、クレードを細分化させながら進化している¹⁵⁾。異常を早い段階で探知するためにも、このような継続したモニタリングが非常に重要である。また、全国の地方衛生研究所で分離された株を国立感染症研究所で解析することで、次期シーズンのワクチン株選定の一助になっており、今後も地方衛生研究所としてその役割を果たし、県内の流行株を把握し続け、データを蓄積していくが重要であると考えられる。

5 文献

- 1) 栃木県感染症情報センター、結核・感染症発生动向調査結果データベース、available at: <http://www.thec.pref.tochigi.lg.jp/tidc/data/data.htm>
- 2) 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター、インフルエンザ診断マニュアル(第4版)、2018
- 3) 国立感染症研究所 感染症疫学センター、〈特集〉インフルエンザ 2013/14 シーズン、病原微生物検出情報月報、35、251-272、2014
- 4) 国立感染症研究所 感染症疫学センター、〈特集〉インフルエンザ 2014/15 シーズン、病原微生物検出情報月報、36、199-223、2015
- 5) 国立感染症研究所 感染症疫学センター、〈特集〉インフルエンザ 2015/16 シーズン、病原微生物検出情報月報、37、211-231、2016
- 6) 国立感染症研究所 感染症疫学センター、〈特集〉インフルエンザ 2016/17 シーズン、病原微生物検出情報月報、38、209-227、2017
- 7) 国立感染症研究所 感染症疫学センター、〈特集〉インフルエンザ 2017/18 シーズン、病原微生物検出情報月報、39、181-202、2018
- 8) Kumar S, Stecher G, Tamura K, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Mol Biol Evol*, 33, 1870-1874, 2016.
- 9) Influenza Virus Resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=database>)
- 10) Kawakami C, et al., Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons. *Euro Surveill*. 24(6), 2019.
- 11) 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(2017/18 シーズン)、available at: <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou01/dl/fludoco1718.pdf>
- 12) Sugaya N, et al., Trivalent inactivated influenza vaccine effective against influenza A(H3N2) variant viruses in children during the 2014/15 season, Japan. *Euro Surveill*, 21(42), 2016.
- 13) 渡邊真治 et al., 卵馴化におけるインフルエンザワクチン(製造)株の抗原性の変化および流行株との抗原性の一致性の評価、病原微生物検出情報 月報、35、269-271、2014
- 14) Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Sep;1323:115-39.
- 15) Allen JD, et al., H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation, *Hum Vaccin Immunother*, 14, 1840-1847, 2018.