

資料

岐阜県におけるインフルエンザウイルスの分離・検出状況 (2011/12～2016/17 シーズン)

西岡真弘, 葛口剛, 山口智博, 小林香夫

要 旨

当所では、感染症発生動向調査の一環として医療機関から患者検体の提供を受けるとともに県内各保健所管内初発の学校内集団発生の生徒・児童から検体を収集し、インフルエンザウイルスの検出・分離を行っている。近年におけるインフルエンザウイルスの県内流行状況を評価するため、2011/12 から 2016/17 シーズンにおける型、亜型、系統別の検出状況、抗原性についてまとめ、比較した。

2011/12 から 2016/17 シーズンの期間中、発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として搬入された 267 検体から AH1pdm09 が 34 検体、AH3 亜型が 176 検体、B 型が 44 検体から検出された。また、学校休業時におけるインフルエンザ検査事業において搬入された 295 検体から AH1pdm09 が 21 検体、AH3 亜型が 60 検体、B 型が 19 検体から検出された。

分離株 HI 価と当該シーズンワクチン株 HI 価を比較すると、AH1pdm09、B 型 (Yamagata 系統)、B 型 (Victoria 系統) は分離株とワクチン株の抗原性の乖離が見られない一方で、AH3 は徐々に差が広がる傾向が見られた。

キーワード：インフルエンザ

1 はじめに

風邪様症状を引き起こす原因ウイルスの1つであるインフルエンザウイルスは抗原性の違いから A,B,C 型の3種類に分けられる。A 型ウイルスはヒト以外の動物にも広く分布している人獣共通ウイルスで、粒子表面にある赤血球凝集素 (ヘマグルチニン:HA) とノイラミニダーゼ (NA) それぞれの抗原性の違いにより HA で 16 種類、NA で 9 種類の亜型が存在し、その組み合わせにより最終的な亜型が決定される。これまでも十～数十年に一度の頻度で、それ以前の流行株とは異なる亜型の組み合わせの新型ウイルスが出現し、ヒトの間で世界的な大流行を引き起こしてきた。そのため、流行亜型の分布や抗原性の変化の実態を監視し、新型ウイルス発生時にその兆候を早期に発見できる体制を整えることが重要となる。

当所では、国の事業である感染症発生動向調査事業 (発生動向調査) の一環として医療機関から患者検体の提供を受けるとともに、学校休業時におけるインフルエンザ検査事業 (集団かぜ) において各シーズン県内各保健所管内で初発となるインフルエンザ様疾患での学級閉鎖発生時に症状のある生徒・児童から検体を収集し、ウイルスの検出・分離を行っている。今回、2011/12 から 2016/17 シーズンの各シーズンにおける流

行状況を、型、亜型、系統別の検出、分離結果、分離ウイルスの抗原性状から解析したので報告する。

2 検査材料及び検査方法

2.1 検体収集

発生動向調査における定点医療機関でインフルエンザと診断・採取された患者の咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液、および集団かぜにおいて収集した症状のある生徒・児童由来のうがい液を検査材料として用いた。

2.2 検査

2.2.1 検体処理

咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液：ぬぐった綿棒を輸送培地 (Medium199, 5% BSA, 200 単位/ml ペニシリン G カリウム, 200 µg/ml 硫酸ストレプトマイシン, 100 µg/ml ゲンタマイシン) に入れてよく懸濁し、遠心分離 (3000rpm, 20 分, 4°C) した上清を検体として回収した。

うがい液：遠沈管に移し、遠心分離 (3000rpm, 20 分, 4°C) した上清を検体として回収した。

2.2.2 ウイルス RNA 抽出及びリアルタイム PCR

Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 及び QIAcube を使用して RNA 抽出を行い、TaqMan プローブを用いた One

Step Realtime RT-PCR 法によりインフルエンザウイルスの型・亜型を決定した。

2.2.3 ウイルス分離

処理済み検体を MDCK 細胞に接種し、33℃に設定したインキュベータ内で細胞変性効果(CPE)を確認した。CPE 確認時または接種7日後に培養上清を回収し、1回凍結融解した後に遠心分離 (3000rpm, 20分, 4℃) して上清を分離株として回収した。3代まで同様に継代し、0.75%モルモット血球を用いて赤血球凝集(HA)試験を行った。

2.2.4 HI 試験

HA 価が 8 以上となったウイルス分離株について各々8HA となるように PBS(-)で希釈し、国立感染症研究所より配布されたインフルエンザウイルス同定キットを用いて HI 試験を行った。分離ウイルスの型、亜型、系統の同定を行うとともに、ワクチン株のホモ価と比較した。

2.2.5 H1N1pdm オセルタミビル耐性株の検出

AH1pdm09 分離株について、One Step Realtime RT-PCR 法により H1N1pdm オセルタミビル耐性株の検出を行った。

3 結果

3.1 インフルエンザウイルス検出状況

2011/12から2016/17シーズンにおけるインフルエンザウイルスの分離、検出状況を表1、2に示す。検体採取日を基に第36週から翌年の第35週までを1シーズンとし、複数の検体が搬入された患者の場合は1患者1検体として集計した。

2011/12 シーズンでは発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として計42検体が搬入され、AH3 亜型が34検体(81%)、B型が5検体(12%)から検出された。また、集団かぜでは計54検体が搬入され、AH3 亜型が19検体(35%)から検出された。

2012/13 シーズンでは発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として計28検体が搬入され、AH3 亜型が18検体(64%)、B型が8検体(29%)から検出された。また、集団かぜでは計51検体が搬入され、AH3 亜型が11検体(22%)、B型が4検体(8%)から検出された。

2013/14 シーズンでは発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として計51検体が搬入され、AH1pdm09が20検体(39%)、AH3 亜型が20検体(39%)、B型が7検体(14%)から検出された。また、集団かぜでは計65検体が搬入され、AH1pdm09が6検体(9%)、AH3 亜型が14検体(11%)、B型が7検体(42%)から検出された。

2014/15 シーズンでは発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として計30検体が搬入され、AH3 亜型が

26検体(87%)、B型が2検体(7%)から検出された。また、集団かぜでは計57検体が搬入され、AH3 亜型が16検体(28%)から検出された。

2015/16 シーズンでは発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として計31検体が搬入され、AH1pdm09が12検体(39%)、AH3 亜型が3検体(10%)、B型が16検体(52%)から検出された。また、集団かぜでは計68検体が搬入され、AH1pdm09が15検体(22%)、B型が8検体(12%)から検出された。

2016/17 シーズンでは発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として計85検体が搬入され、AH1pdm09が2検体(2%)、AH3 亜型が75検体(88%)、B型が6検体(7%)から検出された。感染症法改正に伴って2016年度は搬入検体数の増加が見込まれたことから、2016/17 シーズンは集団かぜの検体収集を行っていない。

表1 発生動向調査におけるインフルエンザウイルス検出状況

	2011 /12	2012 /13	2013 /14	2014 /15	2015 /16	2016 /17	合計
搬入検体数	42	28	51	30	31	85	267
分離または 遺伝子検出	39	26	47	28	31	83	254
内訳 AH1pdm09	0	0	20	0	12	2	34
AH3	34	18	20	26	3	75	176
B	5	8	7	2	16	6	44

表2 集団かぜにおけるインフルエンザウイルス検出状況

	2011 /12	2012 /13	2013 /14	2014 /15	2015 /16	2016 /17	合計
搬入検体数	54	51	65	57	68	-	295
分離または 遺伝子検出	19	15	27	16	23	-	100
内訳 AH1pdm09	0	0	6	0	15	-	21
AH3	19	11	14	16	0	-	60
B	0	4	7	0	8	-	19

3.2 インフルエンザウイルス分離状況

2011/12 シーズンに発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として搬入された検体からは AH3 亜型が30検体(71%)、B型(Yamagata 系統)が3検体(7%)、B型(Victoria 系統)が2検体(5%)から分離された。また、集団かぜとして収集された検体からは AH3 亜型が19検体(35%)から分離された。

2012/13 シーズンに発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として搬入された検体からは AH3 亜型が15検体(54%)、B型(Yamagata 系統)が5検体(18%)から分離された。また、集団かぜとして収集された検体からは AH3 亜型が11検体(22%)、B型(Yamagata 系統)が4検体(8%)から分離された。

2013/14 シーズンに発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として搬入された検体からは AH1pdm09 が17検体(33%)、AH3 亜型が19検体(37%)、B型(Yamagata

系統)が4検体(8%), B型(Victoria系統)が2検体(4%)から分離された。また、集団かぜとして収集された検体からはAH1pdm09が6検体(9%), AH3亜型が14検体(22%), B型(Yamagata系統)が7検体(11%)から分離された。

2014/15シーズンに発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として搬入された検体からはAH3亜型が21検体(70%), B型(Yamagata系統)が2検体(7%)から分離された。また、集団かぜとして収集された検体からAH3亜型が13検体(23%)から分離された。

2015/16シーズンに発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として搬入された検体からはAH1pdm09が12検体(39%), AH3亜型が1検体(3%), B型(Yamagata系統)が11検体(35%), B型(Victoria系統)が4検体(13%)から分離された。また、集団かぜとして収集された検体からはAH1pdm09が15検体(22%), B型(Yamagata系統)が8検体(12%)から分離された。

2016/17シーズンに発生動向調査でインフルエンザ疑い検体として搬入された検体からはAH1pdm09が1検体(1%), AH3亜型が66検体(78%), B型(Yamagata系統)が4検体(5%)から分離された。

2011/12から2016/17シーズンに分離されたAH1pdm09分離株計51検体についてH1N1pdmオセルタミビル耐性株の検出を行ったところ、すべてオセルタミビル感受性株であった。

表3 発生動向調査におけるインフルエンザウイルス分離状況

	2011 /12	2012 /13	2013 /14	2014 /15	2015 /16	2016 /17	合計
搬入検体数	42	28	51	30	31	85	267
分離数	35	20	42	23	28	71	219
内訳 AH1pdm09	0	0	17	0	12	1	30
AH3	30	15	19	21	1	66	152
B(Yamagata)	3	5	4	2	11	4	29
B(Victoria)	2	0	2	0	4	0	8

表4 集団かぜにおけるインフルエンザウイルス分離状況

	2011 /12	2012 /13	2013 /14	2014 /15	2015 /16	2016 /17	合計
搬入検体数	54	51	65	57	68	-	295
分離数	19	15	27	13	23	-	97
内訳 AH1pdm09	0	0	6	0	15	-	21
AH3	19	11	14	13	0	-	57
B(Yamagata)	0	4	7	0	8	-	19
B(Victoria)	0	0	0	0	0	-	0

3.3 インフルエンザウイルス分離株 HI 価とワクチン株ホモ価との比較

2011/12から2016/17シーズンにおいて分離されたインフルエンザウイルス分離株のHI価を各々のシーズンのワクチン株HI価で除したものを表5~表8に示す。HA価が8未満となりHI試験が行えなかった分離

株についてはTaqManプローブを用いたOne Step Realtime RT-PCR法により型別判定を行った。

表5 AH1pdm09分離株HI価のワクチン株ホモ価に対する比

AH1 pdm09	発生動向調査						集団かぜ					
	11 /12	12 /13	13 /14	14 /15	15 /16	16 /17	11 /12	12 /13	13 /14	14 /15	15 /16	16 /17
分離数	0	0	17	0	12	1	0	0	6	0	15	-
HI価	2		1		1				1		7	
1			6		8				5		8	
1/2			4		3	1						
1/4			3									
HA価<8			3									

表6 AH3亜型分離株HI価のワクチン株ホモ価に対する比

AH3	発生動向調査						集団かぜ					
	11 /12	12 /13	13 /14	14 /15	15 /16	16 /17	11 /12	12 /13	13 /14	14 /15	15 /16	16 /17
分離数	30	15	19	21	1	66	19	11	14	13	0	-
HI価	2	2	1									
1	9	4	1	2			1	5	1			
1/2	11	5	2	5	4		5	4	1	6		
1/4	5	4	1	7	16		6	2	1	3		
1/8	4		1	5	1	14	7			2		
1/16	1			1	13					2		
1/32					9							
1/64					8							
1/128					2							
HA価<8			14						11			

表7 B型(Yamagata系統)分離株HI価のワクチン株ホモ価に対する比

B(Yamagata)	発生動向調査						集団かぜ					
	11 /12	12 /13	13 /14	14 /15	15 /16	16 /17	11 /12	12 /13	13 /14	14 /15	15 /16	16 /17
分離数	3	5	4	2	11	4	0	4	7	0	8	-
HI価	8				3							
4					4						5	
2		1			2						2	
1		1			1	1			3		1	
1/2	3	3	4		1	3		4	4			
1/4												
1/8				2								

表8 B型(Victoria系統)分離株HI価のワクチン株ホモ価に対する比

B(Victoria)	発生動向調査						集団かぜ					
	11 /12	12 /13	13 /14	14 /15	15 /16	16 /17	11 /12	12 /13	13 /14	14 /15	15 /16	16 /17
分離数	2	0	2	0	4	0	0	0	0	0	0	-
HI価	1				2							
1/2	2		2		2							

4 考察

AH1pdm09分離株とワクチン株ホモ価のHI価を比較すると、2011/12から2016/17シーズンの間に分離され、HI価を測定できた48株はすべて4倍から1/4倍の間であった。表9のとおり2011/12から2016/17シーズンの間のAH1pdm09のワクチン株は同一であり、HI価の平均が変動している様子も見られないことから、抗原性が変動している傾向は見られず、当県で流行していたAH1pdm09ウイルスはワクチン株と抗原性が類似していたと考えられる。

AH3亜型分離株とワクチン株ホモ価のHI価を比較すると、2011/12から2014/15シーズンの間に分離され、HI価を測定できた117株中94株が4倍から1/4倍の間であったことから、2011/12から2014/15シーズンに当県で流行していたAH3亜型ウイルスはワクチン株

と抗原性が類似していたと考えられる。一方で、2015/16 シーズンに分離された1株、2016/17 シーズンに分離された66株中46株は4倍から1/4倍の間から大きく外れており、2015/16 シーズン以降に当県で流行していた AH3 亜型ウイルスは抗原性がワクチン株と類似していないタイプが多数を占めていたと考えられる。表9のとおり AH3 亜型ワクチン株は毎シーズン変更されている。2014/15 シーズンまではワクチン株の変更が市中で流行している AH3 型ウイルスの抗原性変異に追いついていたが、2014/15 シーズン以降はウイルス抗原性の変異速度にワクチン株変更が追いついていない、もしくは予想した株と異なるタイプのウイルスが流行してしまったと考えられる。もし抗原性の違いの理由が前者であれば、AH3 亜型ウイルスの抗原性の変異速度が予想以上に早くなっている可能性があるため、2017/18 シーズン以降の抗原性について注視する必要がある。

B 型(Yamagata 系統)分離株とワクチン株ホモ価の HI 価を比較すると、2011/12 から 2013/14, 2016/17 シーズンに分離された27株すべて、2015/16 シーズンに分離された19株中16株は4倍から1/4倍の間であり、当該シーズンに当県で流行していた B 型(Yamagata 系統)ウイルスは抗原性がワクチン株と類似していたと考えられる。一方で、2014/15 シーズンに分離された2株は8倍であったことから2014/15 シーズンに流行した B 型(Yamagata 系統)ウイルスは抗原性がワクチン株と類似していない傾向にあったが、2015/16 シーズンのワクチン株の変更によってワクチン株との類似性が修正されたと考えられる。AH3 亜型の場合と異なり、市中で流行している B 型(Yamagata 系統)ウイルスとワクチン株間の類似性を保っていることから、抗原性の変異速度はワクチン株変更で対応できる範囲に収まっていると考えられる。

B 型(Victoria 系統)分離株とワクチン株ホモ価の HI 価を比較すると、2011/12 から 2016/17 シーズンの間に分離された8株はすべて1倍または1/2倍の差であったことから、当県で流行していた B 型(Victoria 系統)

ウイルスはワクチン株と抗原性が類似していたと考えられる。

表9 2011/12 から 2016/17 シーズンのワクチン株

	AH1pdm09	AH3
2011/12	A/California/7/2009	A/Victoria/210/2009
2012/13		A/Victoria/361/2011
2013/14		A/Texas/50/2012
2014/15		A/New York/39/2012
2015/16		A/Switzerland/9715293/2013
2016/17		A/Hong Kong/4801/2014
	B(Yamagata)	B(Victoria)
2011/12	B/Bangladesh/3333/2007	B/Brisbane/60/2008
2012/13	B/Wisconsin/01/2010	
2013/14	B/Massachusetts/02/2012	
2014/15	B/Phuket/3073/2013	B/Texas/2/2013
2015/16		
2016/17		

AH1pdm09, AH3 亜型, B 型(Yamagata 系統)のいずれの場合においても、同一シーズン内における発生動向調査の検体と集団かぜの検体の間で分離株 HI 価に相違は殆どなかった。このことは、シーズン初発の学内集団発生由来のウイルス株がそのシーズンの市中での流行株になる可能性が高いことを意味する。しかしながら、シーズン途中から HI 価が異なるウイルスが主流になる場合もあるため、定期的なサーベイランスが必要であることは言うまでもない。

謝 辞

本事業の実施に当たり、日々の多忙な業務の中、検体の採取、提供、そして当所への検体搬入にご協力をいただきました医療機関及び各保健所の皆様に深謝いたします。

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)。平成26年9月。
- 2) 国立感染症研究所：インフルエンザ H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法 マニュアル平成22年11月

Isolation/detection of influenza virus, Gifu (2011/12~2016/17 season)

Masahiro NISHIOKA, Tsuyoshi KUZUGUCHI, Tomohiro YAMAGUCHI, Yoshio KOBAYASHI

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan