

2013/2014 シーズンの札幌市における インフルエンザウイルスの流行状況

大西麻実 古舘大樹 扇谷陽子 水嶋好清 檜林秀紀 宮田 淳

1. はじめに

札幌市では、感染症発生動向調査として、市内医療機関（患者報告定点、病原体検査定点）の協力のもとに病原体情報を収集し、その発生動向の把握を行っている。定点医療機関から報告されたインフルエンザ患者数及びウイルス検査の結果をもとに、2013/2014 シーズンの札幌市におけるインフルエンザの流行状況について報告する。

また、2013/2014 シーズンは札幌市において抗インフルエンザ薬耐性 A (H1N1) pdm09 ウイルスが高頻度に発生したので、その発生状況及び遺伝子解析等の結果についてあわせて報告する。

2. 調査及び方法

2-1 インフルエンザ患者発生状況

インフルエンザ患者発生状況は感染症発生動向調査における市内の小児科37定点、内科19定点の計56定点医療機関の報告をもとに集計した。

2-2 ウイルスの分離・検出状況

(1) 検査材料

2013年10月から2014年6月までの間に、市内医療機関（小児科 10定点、内科 4定点）を受診した患者から採取された咽頭拭い液等合計334検体（小児科274検体、内科60検体）をウイルス分離の検査材料とした。

(2) ウイルス分離・同定

検査材料は MDCK 細胞（イヌ腎臓由来株化細胞）に接種し、33℃で培養した。同時にアデノウイルス等の他の呼吸器疾患原因ウイルスの分離を目的として検体を KB、RD-18s 細胞等に接種し、36℃

で培養した。継代は3代まで実施した。細胞変性効果 (cytopathogenic effect : CPE) 陽性を確認し、国立感染症研究所（以下、感染研）が示す方法¹⁾ に準じて、赤血球凝集 (Hemagglutination : HA) 試験を行い、一定の HA 価を示した分離株について型・亜型の同定を行った。インフルエンザウイルスの同定には、感染研から配布された同定用キット (A/California/07/2009、A/Texas/50/2012、B/Brisbane/60/2008 (Victoria 系統)、B/Massachusetts/02/2012 (Yamagata 系統)) を用いて、赤血球凝集阻止 (Hemagglutination Inhibition : HI) 試験を実施した。HA 試験及び HI 試験は0.75%モルモット赤血球を用いた。

アデノウイルスはKBまたはRD-18s細胞でCPEを確認した後、中和法により血清型別を行った。血清型別には、感染研分与の抗血清およびデンカ生研製アデノウイルス抗血清を使用した。

エンテロウイルスはKBまたはRD-18s細胞等でCPEを確認後、QIAamp viral mini kitによりRNAを抽出し、CODEHOP VP1 RT-snPCR法²⁾ により遺伝子が増幅したものについて、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、同定した。また、ウイルスが分離されなかった検体については、同様の方法で臨床検体の遺伝子検査を行った。

パラインフルエンザウイルスはMDCK細胞でCPEを確認後、デンカ生研製パラインフルエンザ抗血清を使用してHI試験により同定した。

2-3 A (H1N1) pdm09ウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株の検出

A (H1N1) pdm09ウイルス（以下、AH1pdm09）はノイラミニダーゼ（以下、NA）遺伝子の275番目のアミノ酸がヒスチジン（H）からチロシン（Y）に変異すると、抗インフルエンザ薬のオセルタミビル及びペラミビルに耐性を示す。AH1pdm09と同定された分離株を対象に、MDCK細胞培養上清を用いて、感染研が示す「Allele-specific RT-PCR法によるH275Y変異の検出」¹⁾に準じて、H275Y変異の検出を行った。また、一部の分離株は、ダイレクトシーケンス法によりNA遺伝子の全塩基配列を決定し、Neighbor-joining (NJ)法により系統樹解析を行った。

3. 結果と考察

3-1 インフルエンザ患者発生状況

2013/2014シーズンの札幌市におけるインフルエンザ患者報告数を図1に示す。

定点（56定点）当たりの患者報告数は2013年第47週（11/18～11/24）に流行開始の目安である1.0を超え低めに推移していたが、徐々に増加し、2014年第4週（1/20～1/26）に流行発生注意報の基準値（10.0）を超えた。第7週（2/10～2/16）には、定点当たり54.48と流行のピークになり、全国（第5週、定点当たり34.44）のピークより

高い患者報告数となった。その後、患者報告数は徐々に減少し、第14週（3/31～4/6）に定点当たり10.0以下となり、第18週（4/28～5/4）に定点当たり1.0を下回った。

今シーズンは過去5シーズンの中で3番目の患者報告数19,628人（56定点）であった。

3-2 ウイルス分離・検出状況

2013/2014シーズンのインフルエンザウイルスの初分離は2013年11月4日（第45週）採取の咽頭拭い液から分離されたA (H3N2)ウイルス（以下、AH3 亜型）であった。また、2013年11月15日（第46週）にはAH1pdm09、2013年12月5日（第49週）にはB型ウイルス（Yamagata系統）が初分離され、シーズン前半からAH3 亜型、AH1pdm09、B型ウイルスの混合流行となった。今シーズンの分離株の内訳はAH1pdm09が113株、AH3 亜型が45株、B型ウイルスが100株であった（図1、表1）。B型ウイルスの内訳はYamagata系統が81株、Victoria系統が19株であり、昨年と同様Yamagata系統が多く分離された。

2013年10月から2014年6月までにインフルエンザウイルス以外に分離・検出されたウイルスは、アデノウイルス4株、エンテロウイルス5株、パラインフルエンザウイルス2株であった（表1）。

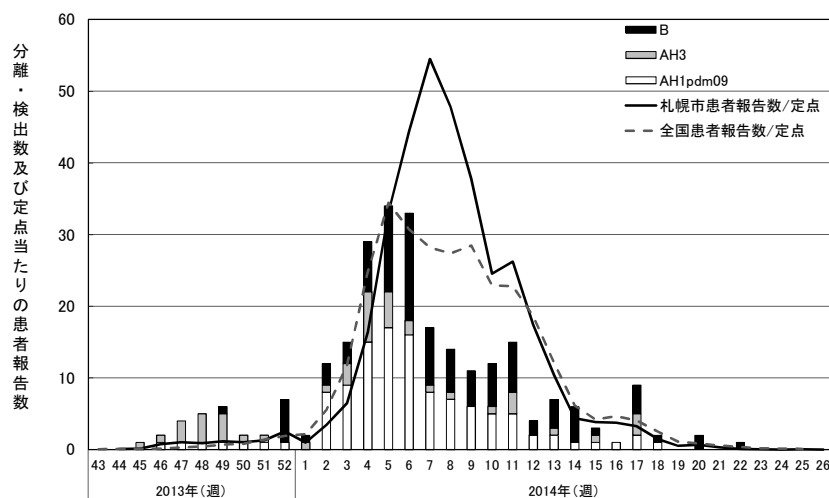


図1 週別インフルエンザ患者報告数とインフルエンザウイルス分離・検出数

表1 小児科・内科病原体定点の検体からのウイルス分離・検出状況

検体採取年月	2013			2014						合計
	10	11	12	1	2	3	4	5	6	
分離ウイルス / 検体数	16	14	27	108	88	44	22	11	4	334
Influenza A(H1)pdm09	-	3	4	48	38 ^{*1}	14	6	-	-	113
Influenza A(H3)	-	9	6	17	4	5	4	-	-	45
Influenza B	-	-	7	25	35	20	9	4	-	100
Adeno 1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2
Adeno 2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2
Coxsackie A6	5	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Para Influenza 1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Para Influenza 3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1

※1 1例はB型ウイルス(Yamagata系統)との重複感染する8倍以上HI価が低下した分離株は45株中4株(8.9%)あったが、大部分はワクチン株と類似していた。

3-3 インフルエンザウイルス分離株のHI価

表2に2013/2014シーズンのインフルエンザウイルス分離株のHI価を示す。また、表3にインフルエンザサーベイランスキットに含まれる抗血清のHI抗体価と、代表的なインフルエンザウイルス分離株のHI価を示す。

今シーズン分離されたAH1pdm09は113株あり、ワクチン株であるA/California/07/2009抗血清(ホモ価1280)に対して、HI価が640~2560の範囲にあり、ワクチン株と類似していた。

45株分離されたAH3亜型はワクチン株であるA/Texas/50/2012抗血清(ホモ価5120)に対して、HI価が640~5120であった。A/Texas/50/2012抗血清のホモ価5120に対して、抗原変異の目安とな

B型ウイルスは100株分離され、このうち81株はB/Yamagata/16/88に代表されるYamagata系統であった。これらはワクチン株であるB/Massachusetts/02/2012抗血清(ホモ価320)に対して、HI価が160~640の範囲にあり、ワクチン株と類似していた。

B型ウイルスのうち19株は、B/Victoria/02/87に代表されるVictoria系統であり、B/Brisbane/60/2008抗血清(ホモ価640)に対してHI価が640~1280の範囲にあり、B/Brisbane/60/2008株と類似していた。

表2 2013/2014 シーズンインフルエンザウイルス分離株のHI価

	HI価		
	640	1280	2560
分離株数 (%)	6 (5.3)	99 (87.6)	8 (7.1)

※A/California/07/2009 (ホモ価1280)

	HI価			
	640	1280	2560	5120
分離株数 (%)	4 (8.9)	24 (53.3)	15 (33.3)	2 (4.4)

※A/Texas/50/2012 (ホモ価5120)

	HI価		
	160	320	640
分離株数 (%)	5 (6.2)	53 (65.4)	23 (28.4)

※B/Massachusetts/02/2012 (ホモ価640)

	HI価	
	640	1280
分離株数 (%)	3 (15.8)	16 (84.2)

※B/Brisbane/60/2008 (ホモ価640)

表3 2013/2014 シーズンにおけるインフルエンザウイルス分離株の HI 試験結果

抗原	抗血清	抗血清に対する HI 価			
		A/ California/ 07/2009	A/ Texas / 50/2012	B/ BRISBANE/ 60/2008	B/ Massachusetts/ 02/2012
A/California/07/2009 (AH1pdm09)		1280	<10	<10	<10
A/Texas/50/2012 (AH3)		<10	5120	<10	<10
B/Brisbane/60/2008 (Victoria)		<10	<10	640	10
B/Massachusetts/02/2012 (Yamagata)		<10	<10	40	640
A/札幌/107/2013 (AH1pdm09)		1280	<10	<10	<10
A/札幌/5/2014 (AH1pdm09)		640	10	10	10
A/札幌/87/2014 (AH1pdm09)		2560	<10	<10	<10
A/札幌/106/2013 (AH3)		<10	5120	<10	<10
A/札幌/121/2013 (AH3)		<10	640	<10	<10
B/札幌/2/2014 (Victoria)		20	20	1280	40
B/札幌/12/2014 (Victoria)		20	20	640	20
B/札幌/30/2013 (Yamagata)		40	40	80	320
B/札幌/36/2014 (Yamagata)		20	20	20	160

3-4 AH1pdm09 の抗インフルエンザ薬耐性株の検出

AH1pdm09 は 2013 年 11 月 15 日 (第 46 週) 採取の咽頭ぬぐい液から初分離され、2013/2014 シーズンは 113 株分離された。これらの分離株について Allele-specific RT-PCR 法により、NA 遺伝子の H275Y 変異の検出を行った。

2013/2014 シーズン札幌市における AH1pdm09 のオセルタミビルに耐性を示す H275Y 変異株 (以下、耐性株) の検出数は 113 株中 34 株 (30.1%) であり、全国の検出率 (4.2% (104 株/2,461 株)、2014 年 7 月 7 日時点)²⁾ と比べ高い傾向にあった。

耐性株の検出状況を図 2 に示す。2013 年 11~12 月にかけて分離された AH1pdm09 は全て耐性株であった。耐性株の検出数は年明けに増加し、2014 年第 4 週に最大 (8 株) となったが、感受性株の増加とともに耐性株の検出数は減少し、第 7 週以降耐性株は検出されなくなった。これらの耐性株 34 株は、感染研において薬剤感受性

試験が実施され、オセルタミビル及びペラミビルに対し感受性が著しく低下しており、ザナミビル及びラニナミビルへの感受性は保持していた。

耐性株 34 株について、NA の遺伝子解析を行った。34 株のうち 33 株は NA 遺伝子の塩基配列がほぼ一致していた。また、感染研において実施

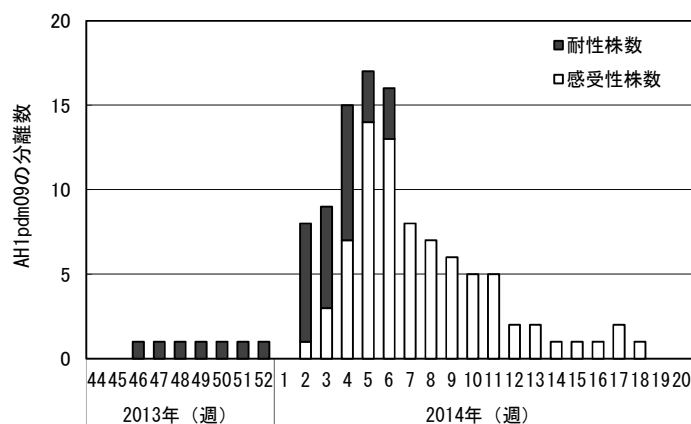


図2 2013/2014 シーズン AH1N1pdm09 ウイルスのオセルタミビル耐性株の検出状況

されたヘマグルチニン (HA) の遺伝子解析の結果、33株は塩基配列がほぼ一致しており、15番目のアミノ酸がスレオニン (T) からセリン (S) へ、283番目のアミノ酸がグルタミン酸 (E) からアスパラギン酸 (D) への共通のアミノ酸変異がみられた。同様の耐性株は北海道や三重県、山形県、神奈川県などで検出されている^{3) 4)}。33株の耐性株は、NA 及び HA 遺伝子がほぼ一致していることから同一由来であり、検体採取前に抗インフルエンザ薬の投与を受けていないことや散発的な発生状況などから、ヒト-ヒト間で伝播していたと考えられる。これらの耐性株の感染経路は不明であるが、NA 及び HA 遺伝子の解析から、2013年9月以降に中国で検出された耐性株と由来が同一である可能性が示されている⁴⁾。

また、耐性株34株のうち1株 (2014年2月3日 (第6週) 検体採取) は、NA 及び HA の遺伝子解析の結果、塩基配列が他の33株と異なり、2014年1月以降に分離された感受性株と類似していた (図3)。この1例は2014年1月30日にインフルエンザを発症し、検体採取前の1月30日~2月3日までタミフル (オセルタミビル) の投与を受けていたことから、薬剤の選択圧により耐性株が発生した散発例と考えられる。

今シーズン検出された耐性株 34 株は、ワクチン株である A/California/07/2009 (ホモ価 1280) に対して 640~2560 の範囲にあり、耐性株と感受性株で大きな差はなかった。感染研における HA 遺伝子の解析からも大きな抗原性の変異が確認されていないことから、ワクチン株と類似の抗原性であったと考えられる。

なお、今シーズン札幌市で分離された AH3 亜型、B 型ウイルスの一部について、感染研において実施された薬剤感受性試験の結果、抗インフルエンザ薬への感受性が低下した分離株は検出されていない⁵⁾。



図3 札幌市で分離された AH1N1pdm09 ウイルスの NA 遺伝子系統樹解析 (1,410bp)

4. まとめ

2013/2014 シーズンは、AH3 亜型がシーズン初分離となり、過去 2 シーズンと同様に主流になると思われたが、AH1pdm09 が徐々に増加し、また、B 型ウイルスが例年より早くに分離されたため、シーズン前半から AH3 亜型、AH1pdm09、B 型ウイルスの混合流行となった。分離されたインフルエンザウイルスの型・亜型の比率は、AH1pdm09 が 43.8% (113 株)、AH3 亜型が 17.4% (45 株)、B 型が 38.8% (100 株) であり、昨シーズン分離されなかった AH1pdm09 の割合が多いのが特徴であった。

また、今シーズン分離された AH1pdm09 は、113 株のうち 34 株が耐性株であり、1 株を除く 33 株は HA 及び NA 遺伝子がほぼ一致しており、これらの耐性株がヒト-ヒト間で伝播し、シーズン前半札幌市を中心に地域的に流行していたと考えられる。耐性株は感受性株に次第に淘汰され、検出されなくなったが、その出現率は増加傾向にあり、また、AH1pdm09 の二重耐性株 (H275Y/I223R)⁶⁾ の検出報告もあることから、今後ますます抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの発生に注意が必要である。

インフルエンザウイルスの分離やその抗原性などの性状を明らかにすることは、インフルエンザの流行状況の把握、流行予測およびワクチン株の選定などの予防対策に不可欠であり、また、抗インフルエンザ薬サーベイランスは、患者の治療を含めた感染症対策に重要である。さらには新型ウイルス対策の一環としても、インフルエンザの発生動向に注意を払い、監視を続けることが重要である。

謝辞：ご教示、ご協力いただきました国立感染症研究所インフルエンザセンター第 1 室高下恵美先生をはじめ諸先生方、北海道立衛生研究所の諸先生方、医療機関等の皆様に深謝致します。

5. 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 2 版 2014 年 3 月
- 2) Nix WA, et al., Clin Microbiol **44**, 2698-2704, 2006
- 3) 矢野拓弥、他：家族内感染が疑われたオセルタミビル投与前の小児患者から分離された抗インフルエンザ薬耐性 A (H1N1) pdm09 ウイルス、病原微生物検出情報, **35**, 43-45, 2014
- 4) 高下恵美、他：山形県で検出された抗インフルエンザ薬耐性 A (H1N1) pdm09 ウイルス、病原微生物検出情報, **35**, 76-78, 2014
- 5) 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第一室：抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2014 年 6 月 9 日 (<http://www.nih.go.jp/niid/images/flu/resistance/20140609/dr13-14j20140609-4.gif>)
- 6) 高下恵美、他：日本国内で初めて検出された H275Y/I223R 二重耐性変異をもつノイラミニダーゼ阻害剤耐性インフルエンザ A (H1N1) pdm09 ウイルス、病原微生物検出情報, **35**, 176-177, 2014