

## 茨城県におけるインフルエンザウイルスの検査状況（2015/2016シーズン）

○土井 育子, 黒澤 美穂, 梅澤 昌弘, 後藤 慶子, 本谷 匠, 永田 紀子

### 要旨

2015/16 シーズンにおけるインフルエンザの茨城県内の発生動向は、2016 年第 1 週に流行指数が 2.31 となり流行が始まった。第 6 週に流行のピークとなり、第 19 週に流行指数が 1.00 を下回り終息した。2015/2016 シーズンは AH1pdm09 および B 型が流行の主流であった。感染症発生動向調査に基づくウイルスサーベイランス等で採取された検体についてリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子検出、ウイルス分離・同定および抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを行ったので、報告する。

キーワード: インフルエンザ 感染症発生動向調査 リアルタイム RT-PCR ウイルス分離 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス

### 1. まえがき（序文）

全国における 2015/16 シーズンの流行状況は、2016 年第 1 週に定点当たりの報告数が 2.03 となり、流行開始の指標である 1.00 を上回った。全国的に 2015/16 シーズンは、2 シーズンぶりに AH1pdm09 が主流となった<sup>1)</sup>。

県内については、全国と同じく 2016 年第 1 週にインフルエンザ流行指数が 2.31 となり、インフルエンザの流行が始まった。第 3 週には流行指数が 11.90 となり注意報が、第 5 週には 37.61 となり警報が発令された。第 6 週には流行のピーク（流行指数：39.44）をむかえ、第 13 週に警報解除、第 19 週には流行指数が 1.00 を下回った<sup>2)</sup>（図 1）。

県内の状況を前シーズンと比べると、流行の開始は 6 週遅く、流行のピークも 3 週遅かった。ピーク時の流行指数は前シーズンの 30.92、前々シーズンの 27.51 よりも大きく、過去 3 シーズンでは最大であった。また、流行指数が終息基準値となる 10.00 を下回ったのは前シーズンよりも 6 週遅かった<sup>2)</sup>。

衛生研究所では感染症発生動向調査におけるウイルスサーベイランスとして病原体定点

医療機関で採取された検体、重症例及び集団発生事例で採取された検体について遺伝子検査、ウイルス分離、血清型別等の検査を行っている。また、AH1pdm09 分離株について抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施している。2015/16 シーズンにおけるこれらの検査結果について報告する。

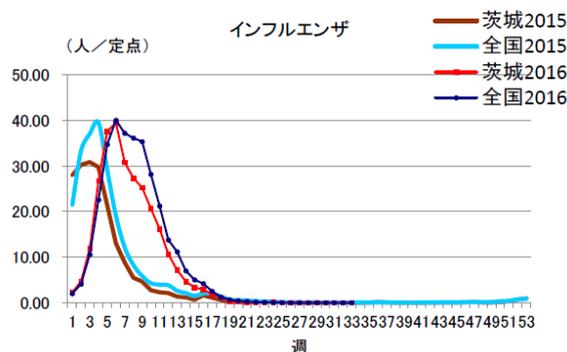


図 1 定点あたり患者数（茨城県・全国）

### 2. 実験（調査）方法

#### 2-1 材料

2015 年 9 月 1 日から 2016 年 8 月 31 日までの間、県内の病原体定点等医療機関で採取された咽頭または鼻腔ぬぐい液 81 検体(81 件(名))

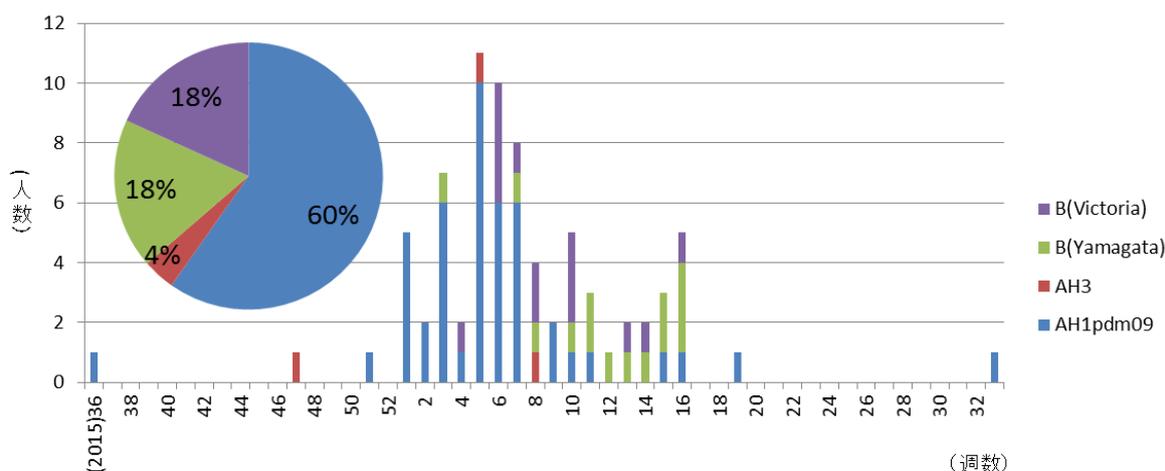


表 1 病原体定点等医療機関における検出状況

分), 学校等集団発生事例 (13 事例) で採取された 116 検体 (86 件(名)分: うがい液 40 検体, 鼻かみ液 76 検体), 病院・介護施設等集団発生事例 (3 事例) で採取された 15 検体 (14 件(名)分: 鼻かみ液 8 検体, 鼻腔ぬぐい液 7 検体) の計 212 検体 (181 件(名)分) を検査材料とした。

2-2 方法

-1. 臨床検体からのインフルエンザウイルス遺伝子の検索

衛生研究所に搬入された臨床検体を, QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出し, リアルタイム RT-PCR 法による A 型ウイルス共通の M 遺伝子, AH1pdm09, AH3, B 型, B 型ビクトリア系統および B 型山形系統の HA 遺伝子の検索を行った。方法は国立感染症研究所の「インフルエンザ診断マニュアル (第 3 版) (平成 24 年 9 月)」に従って行った。

-2. インフルエンザウイルスの分離

搬入された検体を, 48 穴マイクロプレートに培養した MDCK 細胞に接種し, トリプシンを添加した維持培地を用いて 5%CO<sub>2</sub>, 35°C で 7 日間培養した。このうち, 細胞変性効果 (CPE) が確認されたものについて培養液を回収し,

遠心した上清を用いて赤血球凝集 (HA) 試験を行った。

赤血球凝集試験には 0.75%モルモット赤血球浮遊液を用いた。細胞変性効果がみられなかったものについては 3 代目まで継代培養を行った。

-3. 分離ウイルス株の血清型別及び同定

分離されたウイルスについて 0.75%モルモット赤血球浮遊液を用いた赤血球凝集抑制 (HI) 試験を行い, 同定を行った。HI 試験には国立感染症研究所配布の 2015/2016 シーズン用インフルエンザウイルス同定キット, A/California/7/2009((H1N1)pdm09) A/Switzerland/9715293/2013(H3N2) B/Phuket/3073/2013 (Yamagata 系統) B/Texas/2/2013(Victoria 系統)

の各ウイルス抗原および抗血清(ウサギ免疫血清およびフェレット感染血清)を用いた。分離されたウイルスのうち, HA 価が十分に得られなかったウイルス株についてはリアルタイム RT-PCR 法により同定を行った。

-4. インフルエンザウイルスの遺伝子解析

分離されたウイルスについて, インフルエンザウイルスの抗原性を示す HA 遺伝子の HA1 領域を RT-PCR 法により増幅し, ダイレクト

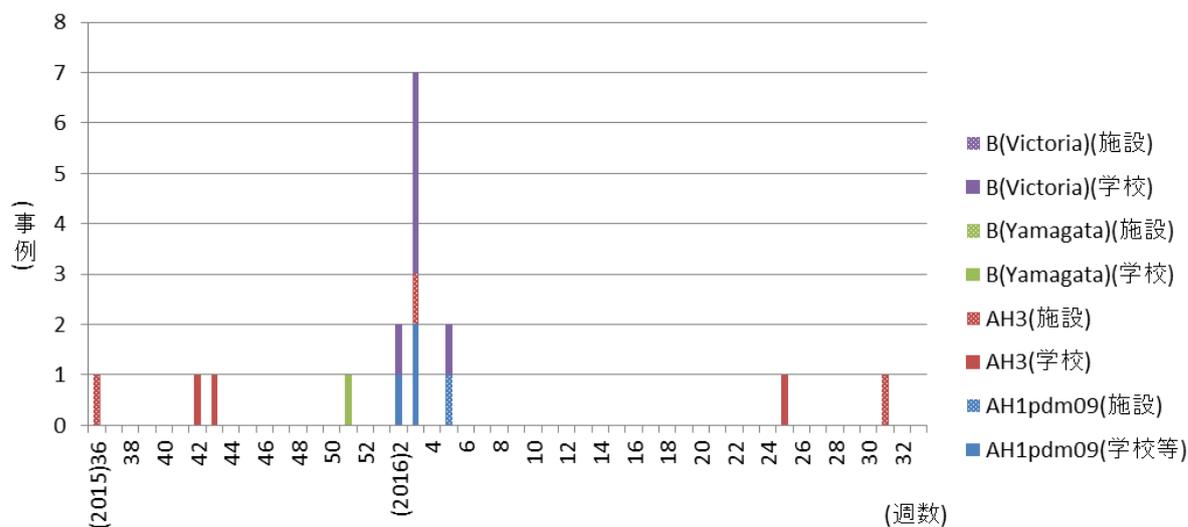


表 2 学校および施設における検出集団事例数

シーケンス法にて塩基配列を決定し遺伝子系統樹解析を行った。

**-5. 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス**

分離された AH1pdm09 ウイルスについては、「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver.2 (国立感染症研究所)」にしたがい、One-step RT-PCR(TaqMan Probe 法)により、NA 阻害薬耐性変異である NA 遺伝子上の H275Y 変異の有無について調べた。

**3. 結果**

**-1. 臨床検体からのインフルエンザウイルス遺伝子の検出**

検査を行った 181 件のうち、165 件 (91.2%) からインフルエンザウイルスの遺伝子が検出された。その内訳は、AH1pdm09 が 66 件(40.0%)、AH3 が 27 件 (16.4%)、B 型 Yamagata 系統が 20 件(12.1%)、B 型 Victoria 系統が 52 件(31.5%)であった。

また週別の検出状況について、病原体定点等医療機関で採取された検体についての件数を表 1 に、学校および施設における集団事例数を表 2 に示した。

**-2. ウイルス分離**

搬入された検体のうち 175 検体(157 件)についてウイルス分離培養した結果、143 検体 (135 件) よりウイルスが分離された。

検体の種類ごとに分離陽性率をみると、咽頭及び鼻腔ぬぐい液で 98.8%(84 検体中 83 検体)、鼻かみ液で 69.8%(63 検体中 44 検体で分離)、うがい液で 57.1%(28 検体中 16 検体で分離)であった。

**-3. 分離株の血清型別および同定**

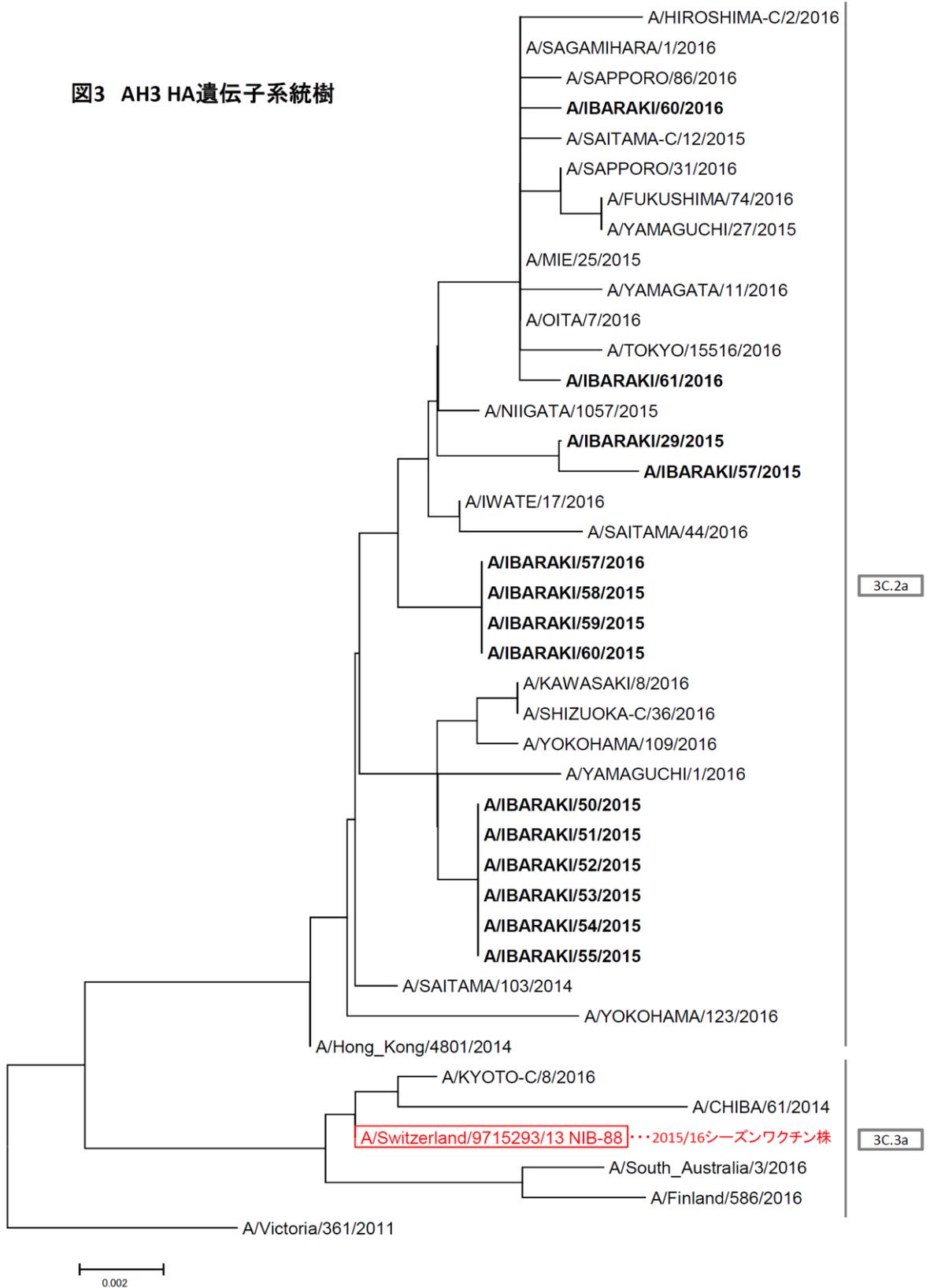
分離されたウイルス 143 株について、赤血球凝集抑制試験(HI)およびリアルタイム RT-PCR により血清型別を行ったところ、AH1pdm09 が 62 株(60 件)、AH3 が 15 株(14 件)、B 型 Yamagata 系統が 19 株 (19 件)、B 型 Victoria 系統が 47 株 (42 件) であった。

**-4. 分離ウイルスの遺伝子解析**

分離されたウイルスの中から AH1pdm09 49 株、AH3 14 株について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の解析<sup>3)</sup>を参考に HA 1 遺伝子領域の系統樹解析を行い、その結果を図 2 および図 3 に示した。



図3 AH3 HA遺伝子系統樹



#### -5. 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス

分離された AH1pdm09 60 株(60 件分)について、One-step RT-PCR(TaqMan Probe 法)により H275Y の耐性マーカーの検索を行った結果、H275Y 耐性変異株が 1 株、H275H/Y 耐性ミックス株が 1 株検出された。

#### 4. 考察

今シーズンは流行の開始が第 1 週、ピークが第 6 週と昨シーズンと比較すると遅い傾向がみられたが、ピーク時の流行指数は 39.44 と過去 10 シーズンでは 2012/13 シーズンに次いで 2 番目の高さであった<sup>2)</sup>。シーズンはじめの 2015 年第 36 週、42 週および 43 週には施設や学校で AH3 ウイルスによる集団事例の発生が続いた<sup>4)</sup>。そのため、前シーズンに引き続き流行の主流は AH3 が予想がされた。しかし、その後病原体定点医療機関から提出のあった検体については 51 週から AH1pdm09 の検出が優位に続き、結果的には全国と同様約 60% が AH1pdm09 であった。また、B 型については定点医療機関からの検体の約 36% から検出され (Yamagata 系統 18%, Victoria 系統 18%), 学校等においても県内 12 保健所の初発例 12 事例中 7 事例が B 型 (Yamagata 系統 1 事例, Victoria 系統 6 事例) であった。前シーズンは B 型の検出割合は全体の 9.5% であり、その内訳もすべて Yamagata 系統であったことから、全体的に昨シーズンとは異なる流行状況がみられた。

県内事例より分離された AH1pdm09 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスにおいては 2 件の耐性変異株が検出された。このうち 1 株は H275Y 変異に加えて I223K 変異も獲得した二重耐性変異株であった。今シーズン、薬剤耐性株サーベイランスにおける全国の状況については、解析 2481 株中 47 例(1.9%)に耐性が

確認された(2016 年 8 月末現在)<sup>5)</sup>。しかし耐性株の地域への広がりには観察されていないこと、国立感染症研究所の抗原遺伝子解析および HI 試験においては流行株と同様の結果であったことなどから、県内検出事例はいずれも薬剤感受性流行株が抗インフルエンザ薬の治療投与の過程において耐性変異を獲得したものと考えられた。

全国における今シーズンの AH1pdm09 株の HA 遺伝子解析では、昨シーズンまで流行の主流であったサブクレード 6B に属する株が、今シーズンも引き続き主流であった。今シーズンは、流行株によりサブクレード 6B 内にさらに 2 つのクレードが形成された(6B.1 および 6B.2)<sup>3)</sup>。今回県内事例より分離された 49 株について解析したところ、6B.1 に属する株が 34 株、6B.2 に属する株が 14 株と、県内においては全国と同様の流行状況であったことが示唆された。また、AH3 株についても全国では昨シーズン同様サブクレード 3C.2 内のクレード 3C.2a に属する株が今シーズンの流行の主流であった<sup>3)</sup>。全国的には 3C.3a に属する株も少数検出されているが、県内分離株 14 株はすべて 3C.2a に属する株であり、AH3 の県内流行はこれらの株によるものと考えられた。

県内では第 31 週に高齢者施設における集団事例から AH3 が、第 33 週にウイルスサーベイランスの検体から AH1pdm09 が検出されている。今後新シーズンが始まるにあたり、引き続き発生の動向には注視していく必要があると考える。

文献

- 1) 国立感染症研究所, 今冬のインフルエンザ  
について(2015/16 シーズン)  
<http://www.nih.go.jp/niid/images/idsc/disease/influ/fludoco1516.pdf>
- 2) 茨城県感染症流行情報 (週報), 茨城県感  
染症情報センター  
<http://www.pref.ibaraki.jp/hokenfukushi/eiken/idwr/index.html>
- 3) NESID 「病原体検出情報システム」
- 4) 土井育子,他,  
IASR Vol. 36 :225-226, 2015
- 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  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/influ-resist.html>