

2015/2016 シーズンの札幌市における インフルエンザの流行状況

大西麻実 菊地正幸 檜林秀紀*¹ 濱谷和代 木田 潔

1. 諸 言

札幌市では、感染症発生動向調査事業として、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及び情報提供を行っている。本稿では、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から、2015/2016 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。

2. 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 定点及び内科19 定点の計56 定点医療機関の報告を集計した。

2-2 ウイルスの分離・検出状況

(1) 検査材料

検査材料は、2015 年10 月から2016 年5 月までに、札幌市内定点医療機関（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267 検体（小児科200 検体、内科67 検体）を対象とした。

(2) インフルエンザウイルスの分離及び型・亜型の同定

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。細胞変性効果（cytopathogenic effect : CPE）が認められた場合はウイルス分離陽性とし、認められなかった場合は継代を3代まで行った。ウイルス分離陽性のもについて、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（以下、HA）試験を

行い、一定のHA価を示した分離株について赤血球凝集抑制（以下、HI）試験により型・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（ウサギ免疫血清：A/California/07/2009、A/Switzerland/9715293/2013、B/Texas/2/2013（Victoria系統）、フェレット感染血清：B/Phuket/3073/2013（山形系統））を用いて、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。

また、ウイルス分離を行った検体のうち、HA試験においてHA 価が低く（4HA 以下）、HI試験を行えなかった分離株及びウイルス分離陰性であった臨床検体について、RNA抽出を行い、感染研が示す方法¹⁾ に準じて、リアルタイムRT-PCR法により型・亜型の同定を行った。RNA抽出にはQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いた。

2-3 インフルエンザウイルスのHA 遺伝子解析

2015/2016 シーズンに札幌市内で分離・検出されたウイルスの一部について、インフルエンザウイルスの抗原性状に係わるHemagglutinin (HA) 遺伝子の解析を行った。遺伝子解析は感染研の方法¹⁾ に準じて、RT-PCR法で遺伝子を増幅した後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Neighbor-joining (NJ) 法により系統解析を行った。また、系統解析には感染研において解析された札幌市内の分離株及び参照株等の塩基配列をThe Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) から入手し、用いた。

2-4 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス

AH1N1pdm09 ウイルス（以下、AH1pdm09）は

*1 現西区健康・子ども課健やか推進係長

Neuraminidase(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(以下、H275Y)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。今シーズン、札幌市で分離・検出された AH1pdm09 と同定された分離株について、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 変異の検出を行い、抗インフルエンザ薬耐性株の調査を行った。Allele-specific RT-PCR 法で検出できなかった検体については、ダイレクトシーケンス法により NA 遺伝子の一部の塩基配列を決定し、H275Y 変異の有無を確認した。

また、札幌市で分離されたインフルエンザウイルス分離株の一部について、感染研において薬剤感受性試験¹⁾ が実施された。

3. 結果と考察

3-1 インフルエンザ患者発生状況

2015/2016 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) 当たりの患者報告数は 2015 年第 51 週 (12/14~12/20) に流行開始の目安である 1.0 を超え、2016 年第 3 週 (1/18~1/24) に定点当たり 13.2 と流行発生注意報レベルの基準値 (10.0) を上回り、流行が急速に広がった。2016 年第 5 週 (2/1~2/7)

には、流行のピーク (定点当たり 67.5) になり、その後患者報告数は徐々に減少したが、高めに推移し、第 20 週 (5/16~5/22) に 1.0 を下回った。今シーズンの患者報告数は 23,743 人 (56 定点、6 月 10 日現在) であり、過去 4 シーズンと比べ 2 番目に多かった。

3-2 インフルエンザウイルスの分離・検出状況

2015/2016 シーズンの札幌市におけるインフルエンザウイルスの分離・検出状況 (2016 年 6 月 10 日現在) を図 2 に示す。

AH3 亜型ウイルス (以下、AH3) は 2015 年第 45 週採取の咽頭拭い液から初分離され、今シーズンは 62 株が分離・検出された。昨シーズン札幌市において検出されなかった AH1pdm09 は 2015 年第 53 週採取の咽頭拭い液から初分離され、今シーズンは 69 株が分離・検出された。シーズン前半は AH3 が検出されていたが、流行のピーク時には AH1pdm09 が主流となった。また、B 型ウイルス (Victoria 系統、以下、B 型 Victoria 系統) は 2015 年第 48 週に、B 型ウイルス (山形系統、以下、B 型山形系統) は 2016 年第 2 週採取の咽頭拭い液から初分離された。分離・検出された B 型 63 株の内訳は Victoria 系統が 39 株、山形系統が 24 株で、シーズンを通して両系統が流行していた。

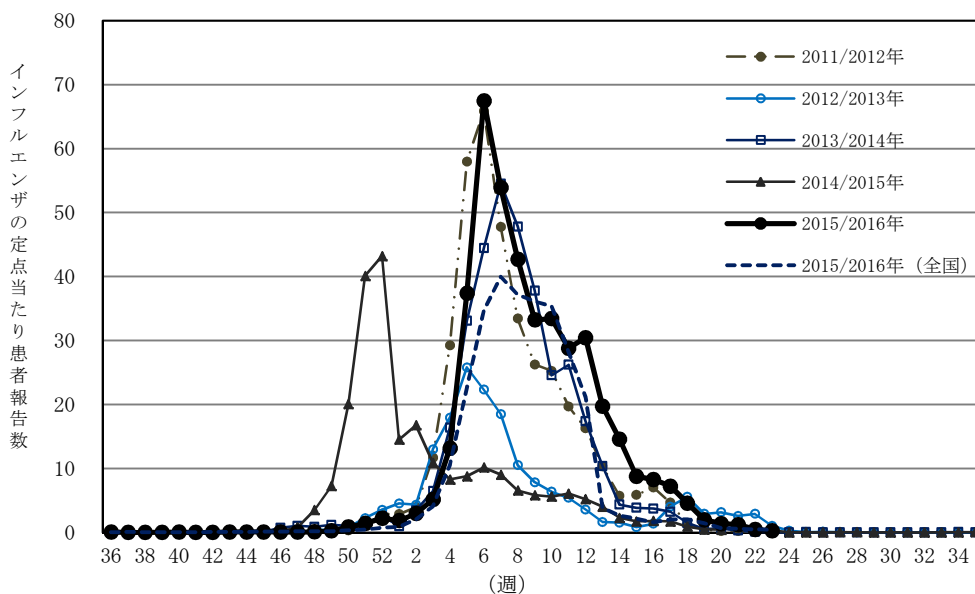


図 1 2012/2013~2015/2016 シーズンのインフルエンザ患者報告数

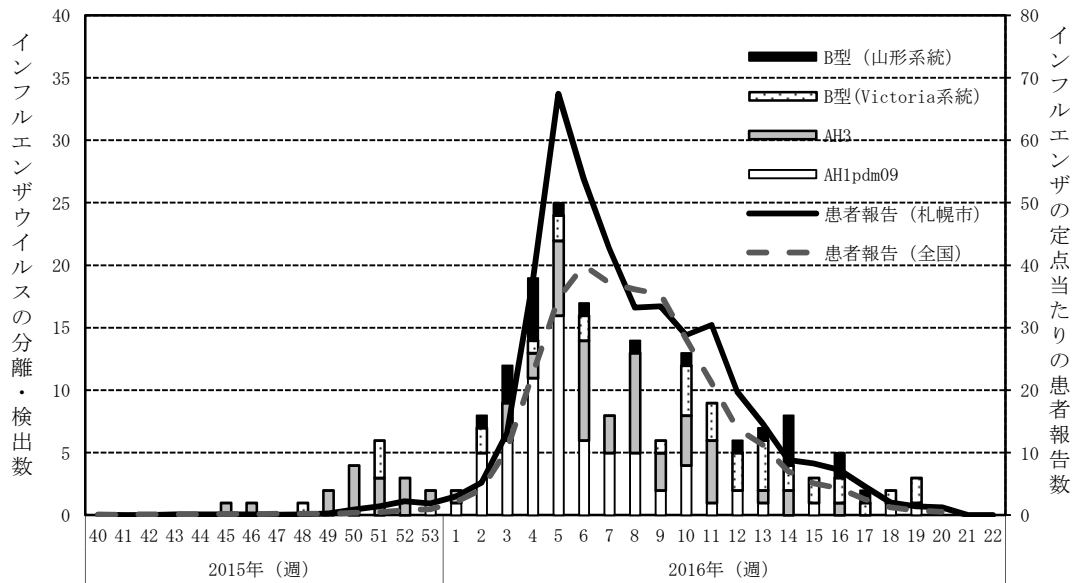


図2 2015/2016 シーズンのインフルエンザウイルス分離・検出状況

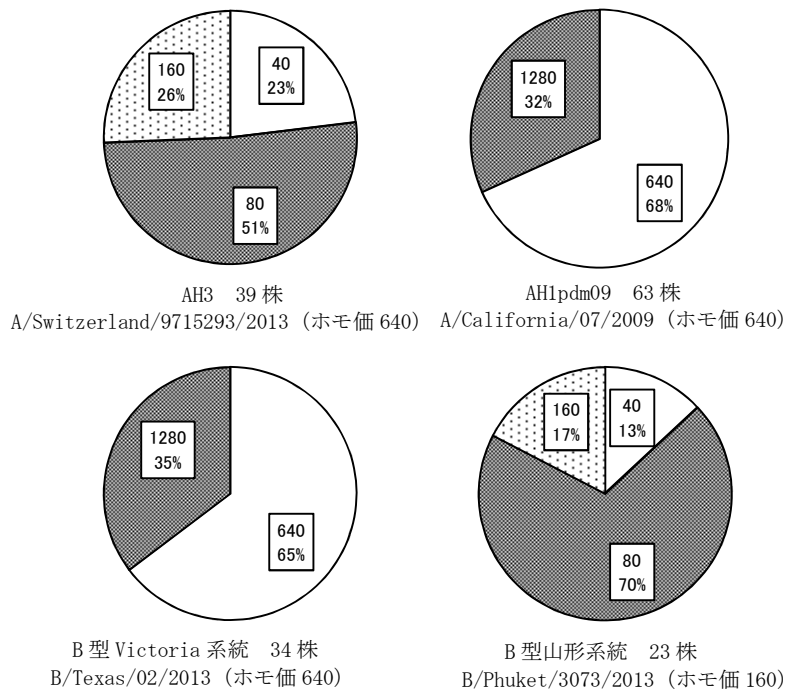


図3 2015/2016 シーズン分離株のHI 試験結果 (HI 価)

3-3 インフルエンザウイルスの型・亜型の同定及びHI試験結果

分離されたインフルエンザウイルスについて、HI試験により型・亜型の同定を行った。図3にHI試験の結果を示す。なお、HI試験は抗原性の把握に用いられていたが、B型山形系統以外はウサギ免疫血清を用いており、この結果から正確な抗原性解析

は行えないため、結果は参考値である。

今シーズン、HI試験により同定されたAH3は39株であった。39株のHI価はワクチン株であるA/Switzerland/9715293/2013抗血清(ホモ価640)に対して40~160の範囲にあった。39株中29株のAH3はワクチン株のホモ価640に対して8倍以上HI価が低下しており、ワクチン株から抗原性が変異し

ている可能性があった。また、感染研において札幌市で分離された AH3 の 7 株について中和試験が行われた。この結果、2 株がワクチン株 (A/Switzerland/9715293/2013) の抗原性変異株であった。

今シーズン、HI 試験により同定された AH1pdm09 は 64 株であった。64 株のうち 63 株について HI 試験を行った結果、HI 価はワクチン株である A/California/07/2009 抗血清 (ホモ価 640) に対して 640~1280 の範囲にあった。1 株は HA 価が上がらず、HI 試験を行うことができなかったため、リアルタイム RT-PCR 法により AH1pdm09 に同定された。また、感染研において札幌市で分離された AH1pdm09 3 株について HI 試験が行われた。この結果、3 株はワクチン株 (A/California/07/2009) の抗原性と類似していた。

HI 試験により同定された B 型 Victoria 系統は 34 株であった。34 株の HI 価はワクチン株である B/Texas/02/2013 抗血清 (ホモ価 640) に対して 640~1280 の範囲にあった。また、HI 試験により同定された B 型山形系統は 23 株であった。23 株の HI 価はワクチン株である B/Phuket/3073/2013 抗血清 (ホモ価 160) に対して 40~160 の範囲にあった。また、札幌市で分離された B 型 Victoria 系統 2 株、B 型山形系統 3 株について感染研において HI 試験が行われた。この結果、5 株全てが各々のワクチン株の抗原性と類似していた。

インフルエンザ様疾患として搬入された臨床検体のうち、MDCK 細胞による分離が陰性であった検体について、リアルタイム RT-PCR 法により型・亜型の同定を行った。この結果、23 検体が AH3、5 検体が AH1pdm09、2 検体が B 型 Victoria 系統、1 検体が B 型山形系統に同定された。

3-4 インフルエンザウイルスの HA 遺伝子解析

2015/2016 シーズンの札幌市において分離・検出されたインフルエンザウイルスの抗原性状に係わる HA 遺伝子の系統解析を行った。図 4~7 に系統樹

を示す。

(1) AH3

今シーズン札幌市で分離・検出した AH3 は 62 株あり、13 株について系統解析を行った。当所において 5 株、感染研において 8 株の遺伝子解析が行われた。この結果、13 株全てがサブクレード 3C. 2a (以下、3C. 2a 株) に属していた (図 4)。昨シーズンと同様²⁾、今シーズンの札幌市において 3C. 2a 株が流行していたと推察される。全国的にも国内分離株の大部分が 3C. 2a 株であり、また世界的にも 3C. 2a 株が優勢であった³⁾。3C. 2a 株は、国内において 2013/2014 シーズン後半から増加し、昨シーズンの主流株となっていた^{4,5)}。図 4 のとおり、今シーズンの 3C. 2a 株は N171K、I406V、G484E のアミノ酸置換をもつ 3C. 2a 株と、R142K、Q197R のアミノ酸置換をもつ 3C. 2a 株が検出された。

(2) AH1pdm09

今シーズン札幌市で分離・検出された AH1pdm09 69 株のうち 6 株について系統解析を行った。当所において 5 株、感染研において 1 株の遺伝子解析が行われた。この結果、5 株はサブクレード 6B. 1 (以下、6B. 1 株)、1 株はサブクレード 6B. 2 (以下、6B. 2 株) に属し、6B. 1 株の割合が多く、国内においても同様であった (図 5)。6B. 1 株及び 6B. 2 株ともに感染研が実施した HI 試験結果よりワクチン株の抗原性と類似していた。

(3) B 型ウイルス

今シーズン札幌市で分離・検出された B 型 Victoria 系統 36 株のうち 1 株について感染研において HA 遺伝子の解析が行われた。1 株について系統解析を行った結果、クレード 1A に属していた (図 6)。また、B 型山形系統の 24 株のうち 1 株について感染研において HA 遺伝子の解析が行われた。1 株について系統解析を行った結果、クレード 3 に属していた (図 7)。

3-5 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス

2015/2016 シーズン札幌市内で分離・検出された

AH1pdm09 69 株について、オセルタミビル・ペラミビルに対し耐性を示す H275Y 変異株について解析を行った。この結果、69 株全てにおいて H275Y 変異は検出されなかった。

また、AH1pdm09 12 株及び AH3 7 株、B 型 Victoria 系統 6 株、B 型山形系統 5 株について、感染研が実施した薬剤感受性試験の結果、全ての株がオセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル及びラニナミビルに対して感受性を保持していた。

今シーズン国内において検出された抗インフルエンザ薬耐性株(2016年6月10日現在)は、AH1pdm09 が 2,326 株解析され、このうち 44 株 (1.9%) がオセルタミビル、ペラミビルに耐性を示すウイルスであった⁶⁾。また、AH3 106 株、B 型 236 株が解析されたが、耐性株は検出されていない。

4. まとめ

2015/2016 シーズンの札幌市におけるインフルエンザの流行は 12 月後半から始まり、急速な拡がりを見せ、1 月中旬から下旬にかけて流行のピークとなり、ピーク後もやや高めに推移した。分離・検出したインフルエンザウイルスの割合は AH3 が 32.5% (62 株)、AH1pdm が 36.1% (69 株)、B 型 Victoria 系統が 18.8% (36 株)、B 型山形系統が 12.6% (24 株)であった。昨シーズンの流行株である AH3 はシーズン前半に検出されたが、ピーク時には 2 シーズンぶりに検出された AH1pdm09 が流行の主流となり、全国的にも同様であった。後半は B 型の割合が増え、昨シーズンの札幌市において検出されなかった Victoria 系統が山形系統より多く検出された。

今シーズン流行していた AH3 は、ワクチン製造時の卵馴化に伴う抗原性の変化の影響^{7,8)}もあり、ワクチン株から抗原性が変異していた可能性があった。一方、今シーズン流行していた AH1pdm09、B 型 Victoria 系統、B 型山形系統の抗原性は、感染研において実施された HI 試験結果からワクチン株に類似していたと推察される。

また、札幌市において分離・検出されたインフルエンザウイルスから抗インフルエンザ薬耐性株は検出されなかったが、今後も動向を監視していく。

謝辞：ご協力いただきました医療機関、保健所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 3 版 平成 24 年 3 月
- 2) 大西麻実, 古舘大樹, 扇谷陽子他：2014/2015 シーズンの札幌市におけるインフルエンザの流行状況, 札幌市衛生研究所年報, **42**, 57-61, 2015
- 3) WHO : Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season February 2016
- 4) 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・WHO インフルエンザ協力センター、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ：病原微生物検出情報, **35** (11), 254-258, 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・WHO インフルエンザ協力センター、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ：病原微生物検出情報, **36** (11), 199-207, 2015
- 6) 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・WHO インフルエンザ協力センター、全国地方衛生研究：抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2016 年 6 月 10 日, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/influ-resist.html>
- 7) 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：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, **35**,
269-271

- 8) 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: 平成 27 年度 (2015/16 シーズン) イン
フルエンザワクチン株の選定経過, 病原微生物検
出情報, **36**, 217-220

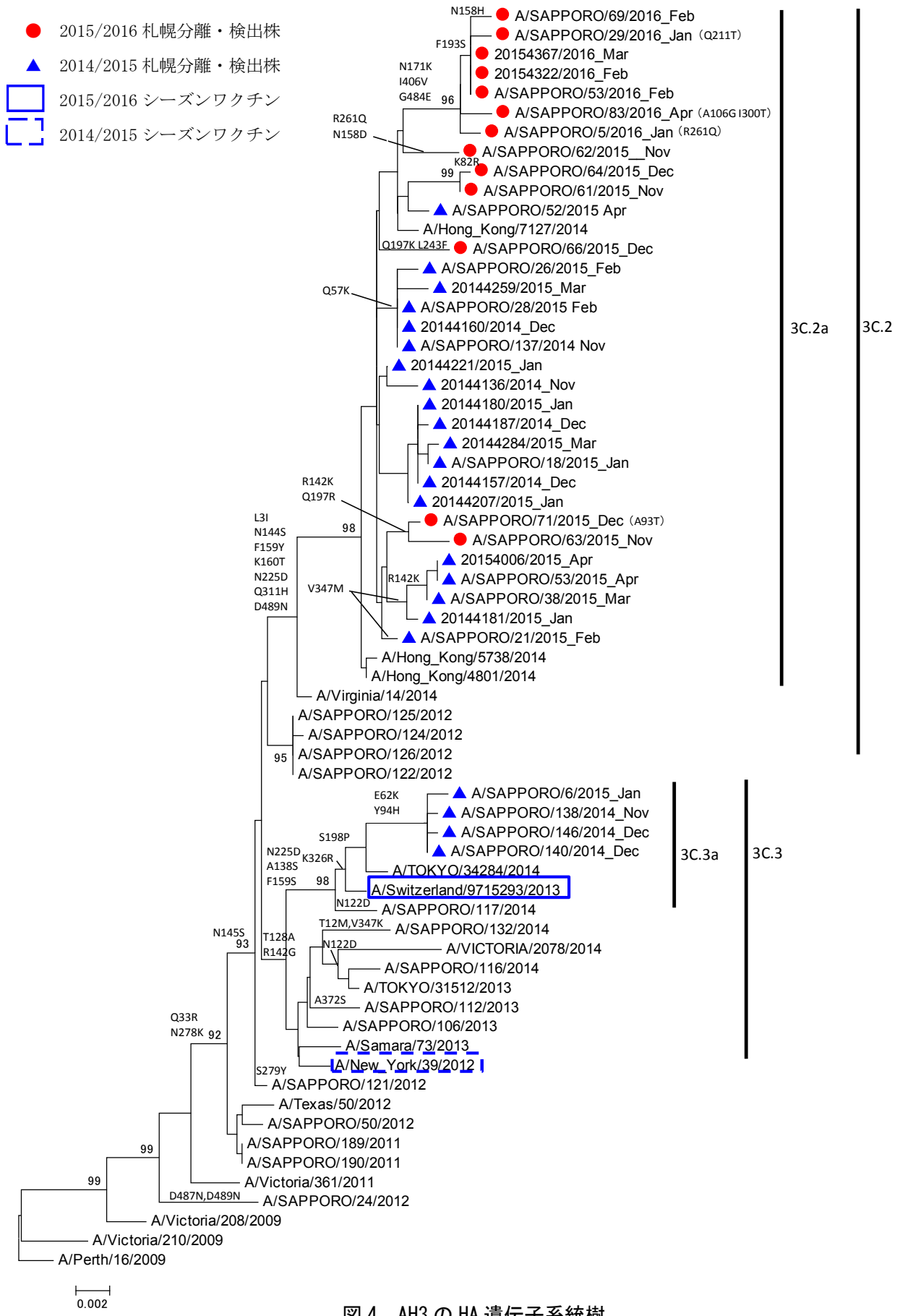


図 4 AH3 の HA 遺伝子系統樹

- 2015/2016 札幌分離株
- 2015/2016 シーズンワクチン

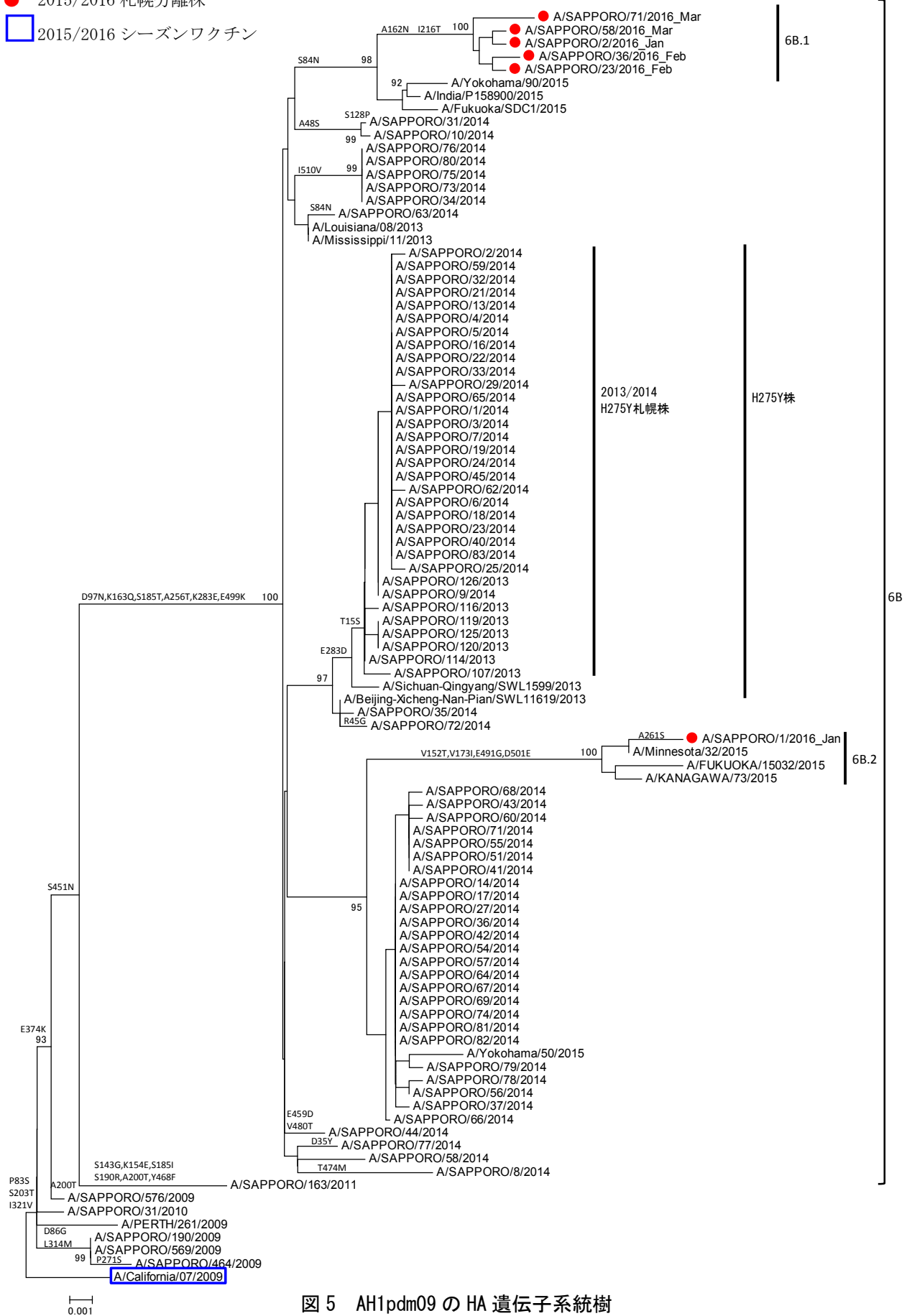


図 5 AH1pdm09 の HA 遺伝子系統樹

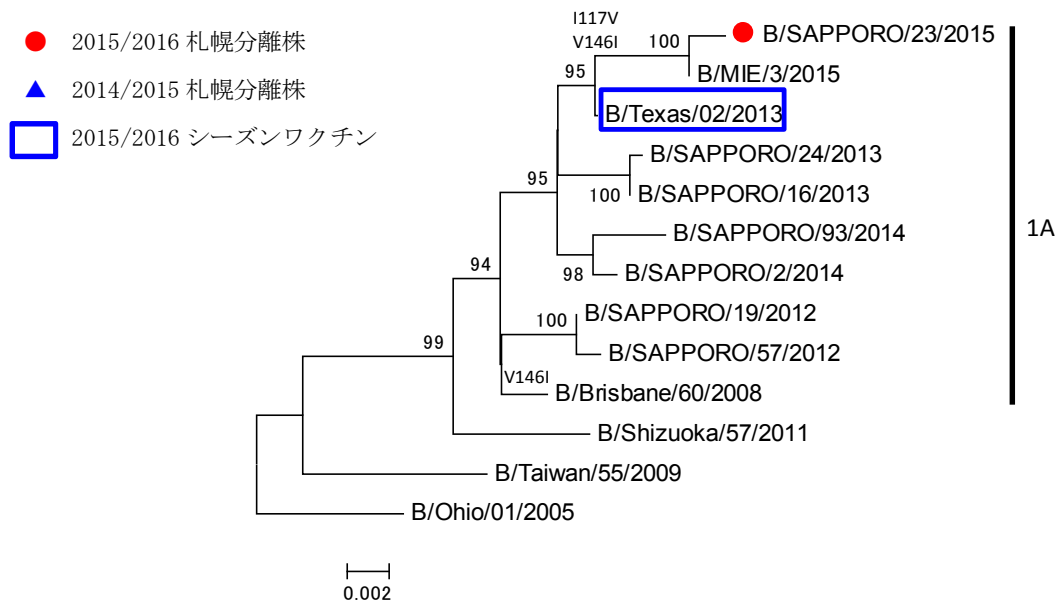


図6 B型 (Victoria 系統) の HA 遺伝子系統樹

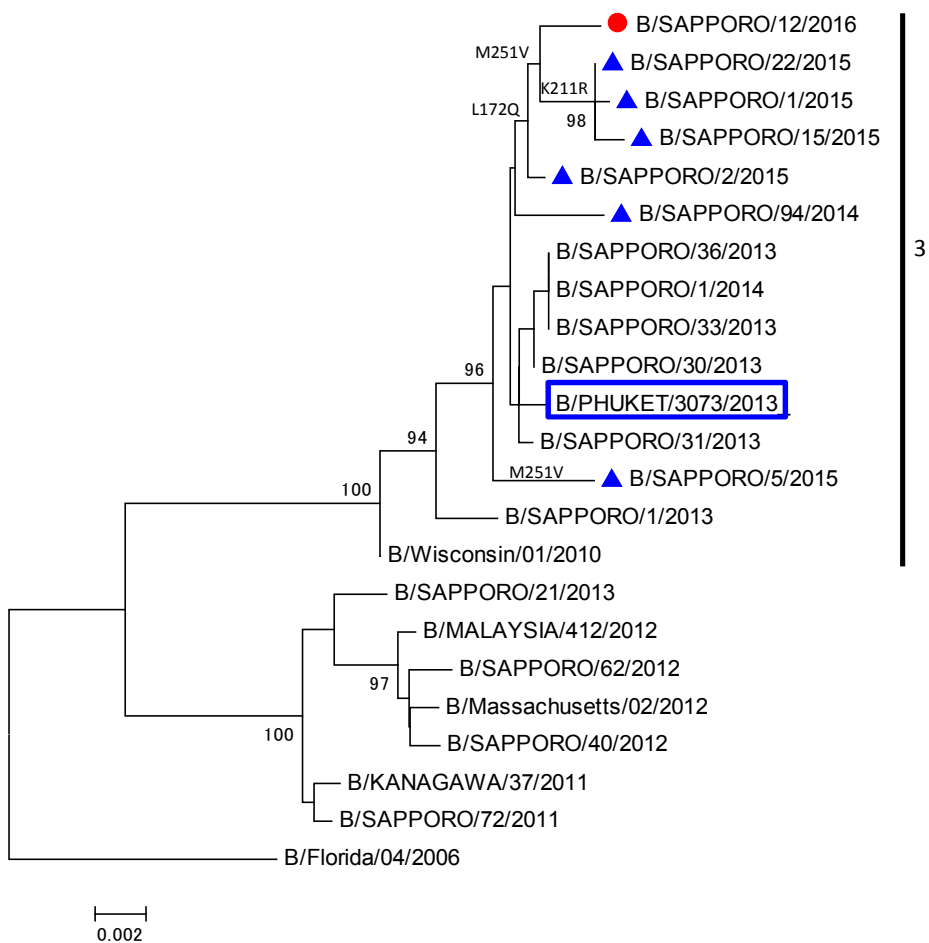


図7 B型 (山形系統) の HA 遺伝子系統樹