

佐賀県におけるインフルエンザの流行 (2009/10シーズン)

微生物課 増本久人 南 亮仁 吉武俊一 江口正宏
吉川信治 武田裕二

キーワード:インフルエンザウイルス AH1 亜型 AH3 亜型 B型 AH1pdm型 耐性株 ウイルス分離
RT-PCR法 遺伝子解析

1 はじめに

平成21年度の佐賀県感染症発生動向調査事業におけるインフルエンザの発生状況調査(2009/10シーズン)および集団発生状況調査を実施したので報告する。

2 材料と方法

1) インフルエンザ患者数の調査

佐賀県感染症発生動向調査事業における病原体定点からの報告(佐賀県感染症情報¹⁾)および佐賀県インフルエンザ施設別発生状況報告²⁾により集計した。

2) ウイルス検出・分離

2009年9月から2010年7月まで、県内定点医療機関(インフルエンザ・小児科・基幹病原体定点)におけるインフルエンザ様疾患患者(以下、散発事例)162名の鼻・咽頭ぬぐい液と、県内の保健福祉事務所管内における初発のインフルエンザ集団発生事例(以下、集団事例)2事例8名のうがい液、計170検体について、インフルエンザウイルスおよびその他のウイルスの検出・分離を行った。

3) ウイルス分離

インフルエンザウイルス分離にはMDCK細胞を用い、分離株の同定は国立感染症研究所から分与された診断用試薬キット、モルモット赤血球を用いたHI試験³⁾により行った。

4) ウイルス遺伝子検出法(表1)

・RNA抽出法については、採取検体別に下記のキットを用いてRNA処理を行った。(表1)

[鼻・咽頭ぬぐい液]→検体140 μ lをQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN, USA)で抽出。

[うがい液]→検体10mlをCentricon Plus-20(MILLIPORE, USA)で濃縮(容量を1.0ml以下)し、QIAamp UltraSens Virus Kit(QIAGEN, USA)で抽出。

・遺伝子検出法については、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル2009年5月ver.1⁵⁾に従ってリアルタイムPCR法(TaqMan Probe法)およびOne-Step RT-PCR法を実施した。

[リアルタイムPCR法の検出亜型]TypeA型(M), SwH1亜型(HA), AH1亜型(HA), AH3亜型(HA)

[One-Step RT-PCR法の検出亜型]TypeA型(M), SwH1亜型(HA), AH1亜型(HA), AH3亜型(HA), B型(HA)

・遺伝子解析法については、One-Step RT-PCR法による陽性産物をBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA)でサイクルシーケンスを実施後、ABI PRISM 310 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems, USA)で塩基配列を解析した(表1)。その後、Vector NTI (Invitrogen, USA)にて解析、NJ法により進化系統樹を作成した。

- ・抗インフルエンザ薬剤耐性遺伝子解析は、国立感染症研究所「抗インフルエンザ薬剤耐性N1-NA遺伝子解析実験プロトコール」に準じ、オセルタミビル耐性の部位であるH275Yのアミノ酸置換の有無について同定を行った。

表1 RNA抽出法

	鼻咽頭ぬぐい液 140ul	うがい液 10ml
濃縮	—	Centricon Plus-20 (MILLIPORE, USA)にて1.0ml以下に濃縮
RNA抽出	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA)	QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN, USA) ・濃縮液が少量の場合は、 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA)

3 結果

1) インフルエンザ患者の発生状況

①散発事例(図1)

佐賀県感染症情報による2009/10シーズンのインフルエンザ患者報告数は18,641名で、初発は前シーズンから終息することなくシーズン当初から患者報告があり、2009年9月上旬(第36週)66名の患者数で定点当たり1.69の患者報告があった。その後12月下旬(第53週)までの年内にかけ合計16,088名の患者報告があった。11月下旬の(第48週)には定点あたり50.87と非常に高いピークを迎えたが、その後は減少傾向を示し12月下旬(第53週)は定点あたり10.51、翌年の2009年1月上旬(第1週)は11.36を示す報告であった。さらに、1月中旬(第2週)頃から定点あたり7.70と減少傾向を示し、4月中旬(第17週)まで定点あたり1.0の報告状況であった。その後、4月下旬(第18週)頃から定点あたり1.0以下となり7月中旬(第29週)まで報告があった。

②集団事例(図1、表2)

佐賀県インフルエンザ施設別発生状況報告による2009/10シーズンの集団発生は、幼稚園119事例、小学校1047事例、中学校467事例、高等学校255事例など計1,976事例、患者総数13,800名であった。初発の集団施設は白石町の小学校で、2009年9月4日(第36週)に報告され、患者数は4名であった。その後、患者数が急増し11月中旬(第46週)には303事例2,160名とピークを迎え、11月下旬(第49週)に226事例1,816名と多い患者発生数であったが、12月上旬(第50週)頃から減少傾向を示し、12月下旬(第53週)に報告数は“0”となった。翌年の2010年1月上旬(第1週)1事例2名、1月中旬(第2週)8事例51名、1月中旬(第3週)12事例73名と3月上旬(第10週)までの合計52事例、患者総数409名の報告があった。

図1 2008/09シーズンにおけるインフルエンザ患者発生状況

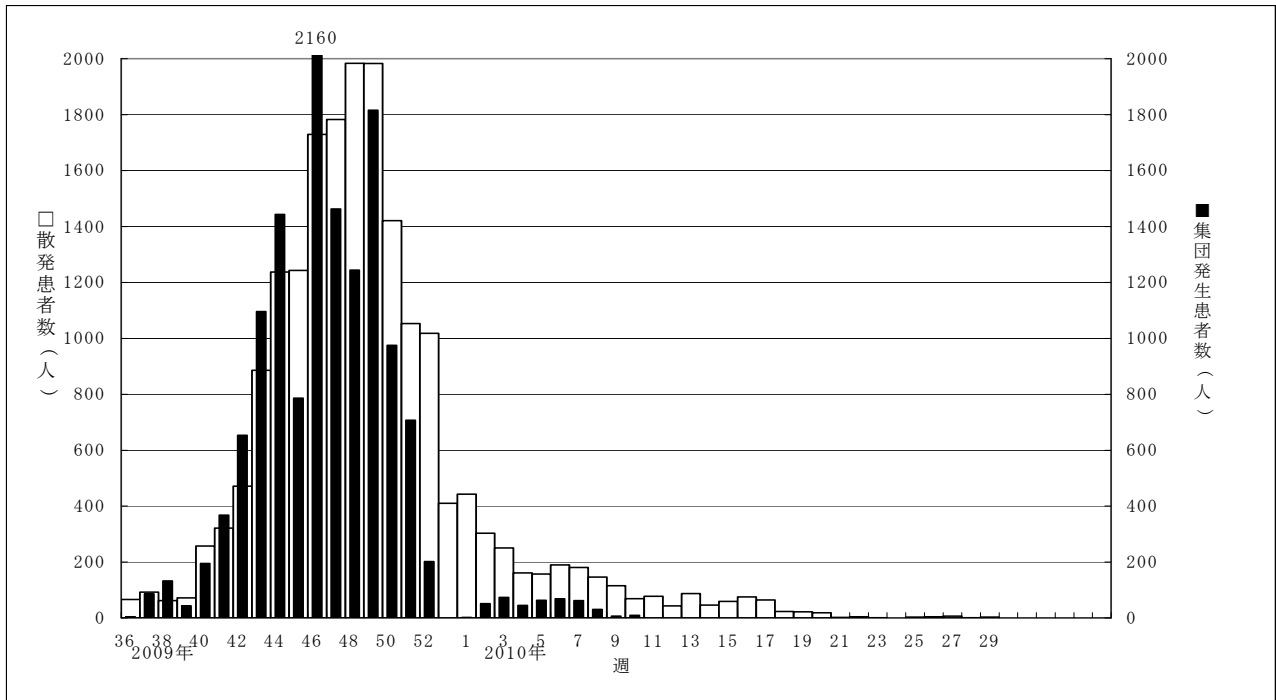


表2 インフルエンザ集団発生施設別発生状況

施設	事例数	患者数	措置		
			休校	学年閉鎖	学級閉鎖
幼稚園	199	1424	32	6	161
小学校	1047	7150	16	288	743
中学校	467	3635	10	93	364
高等学校	255	1534	1	9	245
短期・大学、他	8	57	1	0	7
計	1976	13800	60	396	1520

2) ウイルス検出状況

①散発事例における検出状況（図2、表3）

検体は散発事例の患者162名から採取され、新型インフルエンザAH1pdm型98件と季節性インフルエンザのAH3亜型5件、B型9件を検出・分離した。散発事例のシーズン初検出は、2009年8月31日（第36週）にAH1pdm型をシーズン当初から検出し、続けて9月5日（第36週）に2例目のAH1pdm型を検出した。この2009年9月上旬（第36週）から12月下旬（第53週）の18週間に検出したAH1pdm型の総合計は76件で1週毎の平均は4.22件の検出であった。翌年の2010年1月上旬（第3週）に9件のAH1pdm型を検出した後は減少傾向をたどり4月19日（第16週）の1件を最後に今シーズンはAH1pdm型の流行が終息した。AH3亜型の初検出は2009年9月25日（第39週）でAH1pdm型の流行しているシーズンであった。その後、翌年2010年4月13日（第15週）から7月5日（第27週）まで合計5件を検出した。B型の初発は2010年3月2日（第9週）から3月31日（第13週）まで合計9件のビクトリア系統株を検出した。

今シーズンは、昨シーズンの2009年5月に国内で初検出された新型インフルエンザ AH1pdm 型は、2009年6月より全国各地で次々と検出され大きな大流行を示した。その流行は終息することなく、そのままの流行状況で今シーズンに移行し、AH1pdm 型が大きな流行を示したシーズンであった。AH1pdm 型流行シーズン中の2009年11月29日(第48週)に成人の死亡例1件もあった。さらに、例年、インフルエンザのシーズンに検出していた季節性のAH1 亜型を今シーズン中に検出することはなかったが、季節性のAH3 亜型とB型のビクトリア系統株を2010年3月上旬(第9週)から7月上旬(第27週)までのシーズン後半に検出を認めた。

インフルエンザウイルス陰性であった検体について、他の病原体ウイルスを検索した結果、2009年9月10日(第37週)から2009年12月15日(第51週)にかけ、ライノウイルス4件、エンテロウイルス(亜型不明)1件、RSウイルスA亜型1件、合計6件をPCR法および遺伝子解析で確認された。

図2 2008/09シーズンにおけるインフルエンザウイルス検出状況

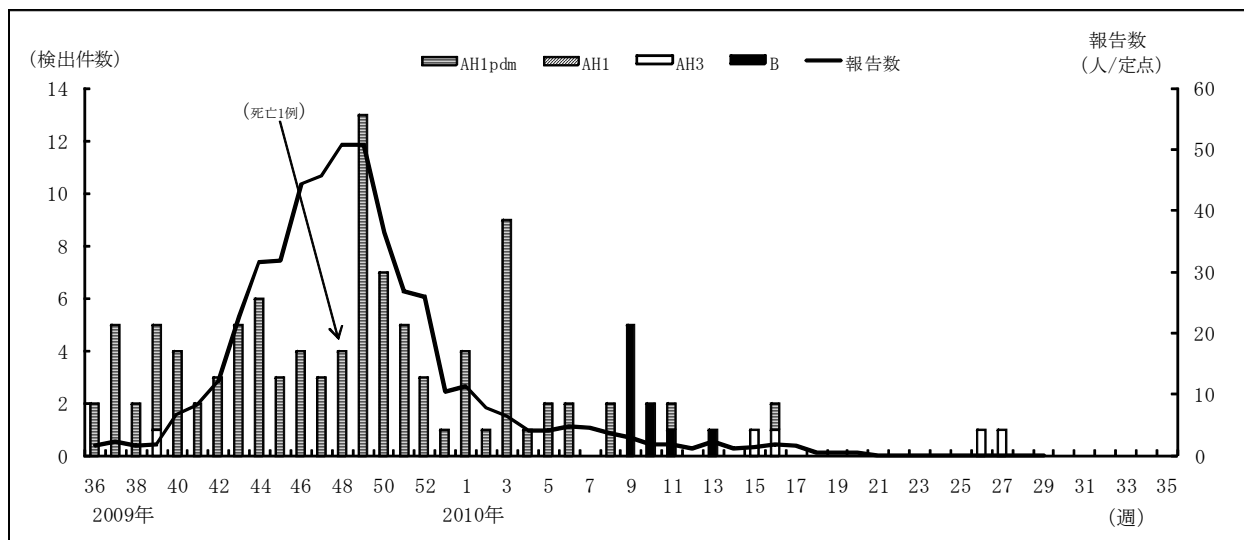


表3 分離株の同定結果

抗原(分離株名)	抗体	A/Brisbane/ 59/2007	A/Uruguay/ 716/2007	B/Brisbane/ 60/2008 (Vic.)	B/Bangladesh/ 3333/2007 (Yama.)	A/California/ 07/2009 (pdm)
A/Brisbane/59/2007		320	<10	<10	<10	<10
A/Uruguay/716/2007		<10	1280	<10	<10	<10
B/Brisbane/60/2008		<10	<10	1280	40	40
B/Bangladesh/3333/2007		<10	<10	<10	1280	<10
A/California/07/2009						1280
(AH1pdm) 散発事例						
A/SAGA/66/2009		<10	<10	<10	<10	640
A/SAGA/85/2009		<10	<10	<10	<10	320
A/SAGA/86/2009		<10	<10	<10	<10	320
A/SAGA/99/2009		<10	<10	<10	<10	320
A/SAGA/106/2009		<10	<10	<10	<10	320
A/SAGA/114/2009		<10	<10	<10	<10	320
A/SAGA/120/2009		<10	<10	<10	<10	640
A/SAGA/121/2009		<10	<10	<10	<10	1280
A/SAGA/132/2009		<10	<10	<10	<10	640
A/SAGA/137/2009		-	-	-	-	640
A/SAGA/143/2009		<10	<10	<10	<10	2560
A/SAGA/153/2009		<10	<10	<10	<10	640
A/SAGA/155/2009		-	-	-	-	640
A/SAGA/158/2009		<10	<10	<10	<10	320

今シーズン分離株は表3のとおりであった。散発事例において分離された AH1pdm 型 14 株については、全ての株が米国で分離された株の A/California/07/2009 (pdm) フェレット抗血清に対し、HI 試験で 2 倍高い力価差を示した株 1 件、同等の力価株 1 件、2 倍低い力価差を示した株 6 件、4 倍低い力価差の株 6 件の HI 価測定結果であった。今回の新型インフルエンザ株の A/California/07/2009 (pdm) は、季節性の AH1N1 型の A/Brsbane/59/2007 株とは全く反応を示さず抗原性が大きく異なっている推察される。

AH3 亜型と B 型の HI 価試験については検出時期が遅かったことで分離等の試験も遅れ、HI 試験に対応できなかった。また、新型インフルエンザ AH1pdm 型の大流行により検出等の対応を優先し分離および HI 試験に対応できなかった。

②集団事例における検出状況 (表4)

集団発生では 2 事例について検査を実施した。検体はうがい液 8 件中、陽性例 7 件で、検出率は 87.5%であった。第 1 事例は福祉施設内で集団発生した患者検体 3 件から AH1pdm 型が検出され、第 2 事例目は小学校内で集団発生した患者検体 4 件から B 型でビクトリア系統株を検出した。

表4 インフルエンザ集団発生施設におけるウイルス検出状況

検体採取日 (週)	管轄保健 福祉事務所	発生地、施設名	検出・分離数	検体数	型
H22.1.19 (3)	佐賀中部	佐賀市、福祉施設	3	3	AH1pdm
H22.4.21 (16)	伊万里	伊万里市、小学校	4	5	B型(ビクトリア系統)

3) 遺伝子解析結果 (図3、4、5、6)

今シーズンの散発事例・集団事例から検出された季節性インフルエンザの AH3 亜型 4 件、B 型 13 件について、HA 領域のアミノ酸配列による遺伝子解析を行った。また、AH1pdm 型の抗インフルエンザ薬剤耐性株(オセルタミビル)の NA 領域(H275Y)41 件について検索を行った。新型インフルエンザ AH1pdm 型については 99 件の検出をしたが、リアルタイム PCR 法による迅速な検出対応と検出優先によりシーケンス測定による遺伝子解析は実施していない。

AH3 亜型の検出例 4 件は、ワクチン株である A/Uruguay/716/2007 とは、やや離れた系統樹の分枝を形成していた。2008/09 年シーズンよりは 2009/10 年シーズンに検出した AH3 亜型 HA 領域(329aa) 4 件は近縁でワクチン株の A/Uruguay/716/2007 と 97%の相同性を示していた。アミノ酸置換部位については、ワクチン株を標準株として検出事例と比較した結果、特に S138A、G142R、K158N、K173Q、N189K、T212A、R194L の各アミノ酸配列部位に置換部位を認めた。

B 型は、昨シーズンの 2008/09 年シーズンに続き、2009/10 年シーズンの散発事例 9 件、集団事例 1 事例 4 件、合計 13 件は全てビクトリア系統株であった。B 型の 2008/09 年シーズンのワクチン株は山形系統の B/Florida/4/2006 株であったが、昨シーズンの検出株はビクトリア系統株が優位に検出されたことで、2009/10 年シーズンのワクチン株はビクトリア系統の B/Brisbane/60/2008 株に変更された。今シーズン検出した B 型 13 件のアミノ酸配列 (244aa) による系統樹解析の結果、ワクチン株である B/Brisbane/60/2008 株とは、やや離れた系統樹の分枝を形成し、ワクチン株との相同性は 98%であった。アミノ酸置換部位についてワクチン株を標準株として検出事例と比較した結果、

特に L58P、I146V、A154E の各アミノ酸配列部位に置換部位を認めた。昨シーズンの 2008/09 年シーズンに検出した事例には置換部位が見られず、今シーズンの検出株に特異的な変異部位であった。

新型インフルエンザ AH1pdm 型の抗インフルエンザ薬剤耐性株 (オセルタミビル)⁸⁾ についてオセルタミビル耐性株として登録された A/Denmark/528/2009 株と検出事例の NA 領域置換部位 (H275Y) について比較検討した結果、今シーズン検出した AH1pdm 型の散発事例 41 件、集団事例 1 事例 3 件の合計 44 株は全て H275H を示しオセルタミビル感受性株であった。

図3 AH3 亜型 HA 領域系統樹解析 (アミノ酸配列)

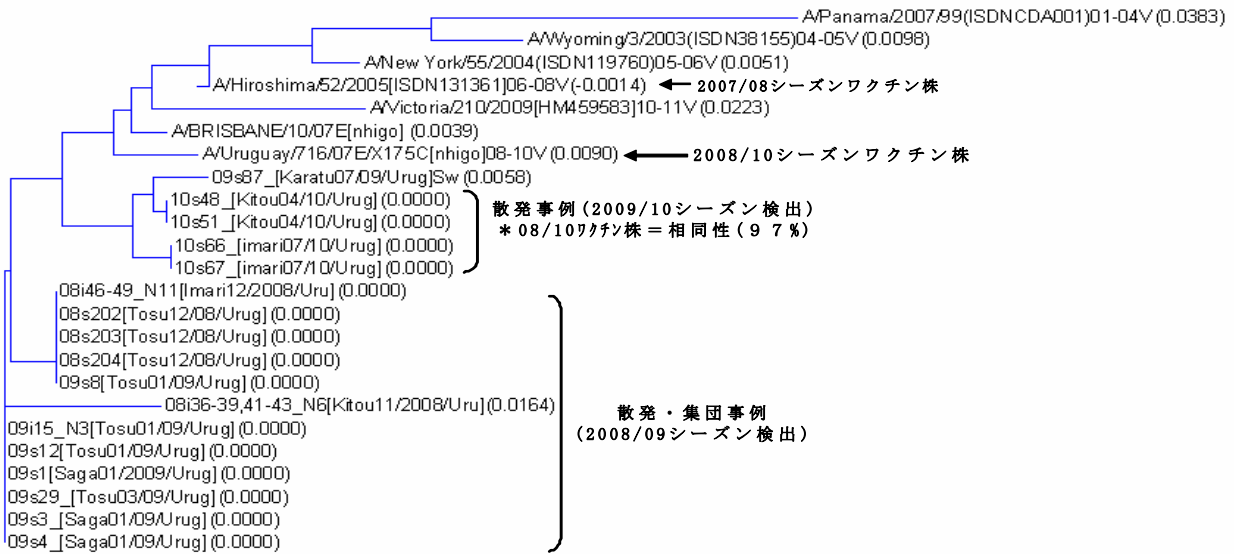
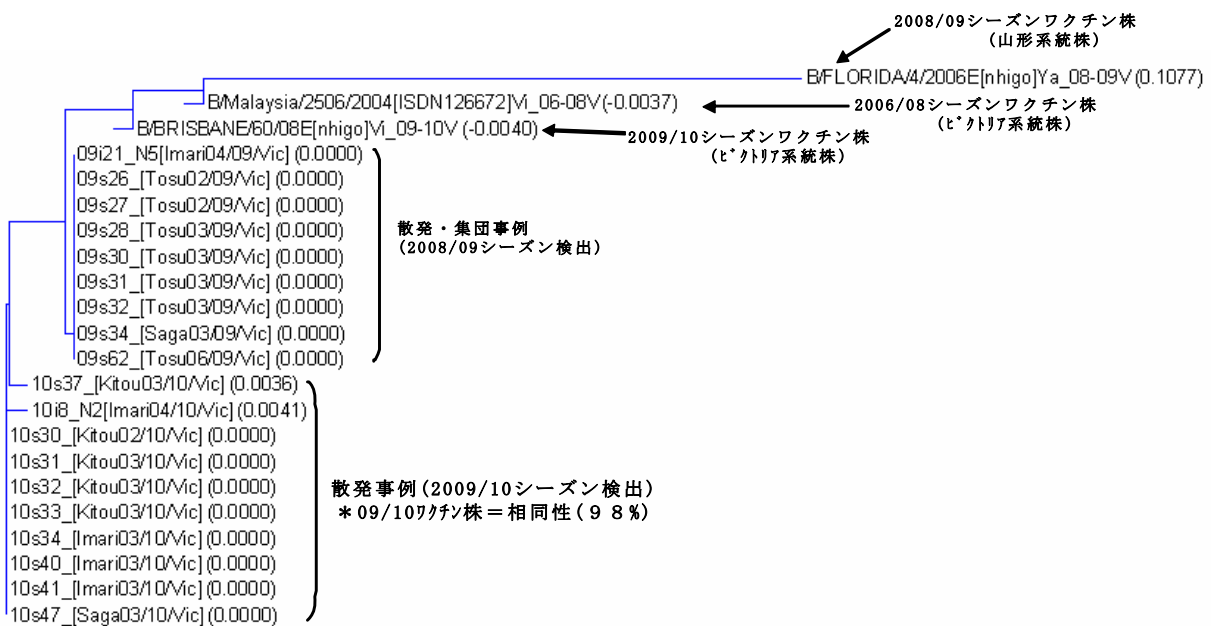


図4 B型 HA 領域系統樹解析



には47歳の慢性疾患を有すAH1pdm型感染患者の1名の死亡例も発生した。AH1pdm型分離株14件については、米国で分離された株でワクチン株のA/California/07/2009(pdm)フェレット抗血清に対し、HI試験で2倍高い力価を示す株や同力価株の他、低力価差でも4倍以内の力価を示す株であった。この所見から各分離株の変異は少なくワクチン株のA/California/07/2009(pdm)株に近縁を示すことからワクチン効果も期待ができると推察される。

季節性のAH1亜型は、2009年2月中旬(第7週)を最後にまとまった検出がなく、AH1pdm型が検出され始めた2009年6月下旬(第27週)1件の検出を最後に、2010年8月下旬(第34週)まで検出していない。

季節性のAH3亜型は、アミノ酸配列(329aa)遺伝子による系統樹解析の結果、ワクチン株であるA/Uruguay/716/2007とは、2008/10年シーズン検出した事例より2009/10年シーズン中に検出した事例が近縁で97%の相同性が見られた。アミノ酸の置換部位についてワクチン株のA/Uruguay/716/2007と比較検討した結果、検出事例4件はK158N、N189K、T212Aに共通した変異部位が確認された。

B型のワクチン株は2008/09年シーズンは山形系統のB/Florida/4/2006株であったが、2シーズン連続してビクトリア系統株が優位に検出されたことから、2009/10年シーズンはビクトリア系統のB/Brisbane/60/2008株に変更された。今シーズン検出したB型13件についてアミノ酸配列(244aa)による系統樹解析の結果、ワクチン株であるB/Brisbane/60/2008株と今シーズン検出事例との相同性は98%で、ワクチン株とはやや離れた系統樹の分枝の形成を示していた。アミノ酸置換部位についてワクチン株のB/Brisbane/60/2008株と比較した結果、今シーズンの検出事例13件は、L58P、I146V、A154Eに変異部位が認められた。今後の変異状況に注視する必要がある、ワクチン接種による効果に期待する。

抗インフルエンザ薬剤耐性株(オセルタミビル)について、2008/09年シーズンはワクチン株であるA/Brisbane/59/2007(A/H1N1)株に対して、検出した季節性のAH1亜型株は、全てアミノ酸置換の(H275Y)部位が確認されオセルタミビル耐性株であった。2009/10年シーズンはAH1pdm型の大流行したシーズンであったが、散発的にオセルタミビル耐性株も報告されたことで、検出事例44件について新型インフルエンザウイルスAH1pdm型のNA領域におけるアミノ酸置換(H275Y)について耐性株として登録されているA/Denmark/528/2009参照株と比較検討した結果、全てH275Hでオセルタミビル感受性株であった。現在のところオセルタミビル耐性を含む、新型インフルエンザウイルスAH1pdm型分離株の抗原性はワクチン株A/California/07/2009に類似し、新型インフルエンザワクチンはオセルタミビル耐性A/H1N1pdm株にも有効である⁸⁾と報告されている。

以上より、今後もインフルエンザの流行と各亜型による変異株の出現に備え、ウイルス病原体の迅速な検出と分離および遺伝子学的な解析を継続的に実施していくことが重要であると考えます。

謝辞

本調査にあたりご協力いただきました健康増進課、各保健福祉事務所および佐賀県医師会成人病予防センター、病原体定点ならびに各医療機関の皆様方に深謝いたします。

文献

- 1) 佐賀県健康福祉本部：佐賀県感染症情報、2008、2009
- 2) 佐賀県健康福祉本部：佐賀県インフルエンザ施設別発生状況について、2008

- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課：感染症流行予測調査事業検査術式、2002
- 4) Herrmann, B. et al: Simultaneous Detection and Typing of Influenza Viruses A and B by a Nested Reverse Transcription-PCR : Comparison to Virus Isolation and Antigen Detection by Immunofluorescence and Optical Immunoassay (FLU OIA), J. Clin. Microbiol., 39(1):134-138, 2001
- 5) 国立感染症研究所：病原体検査マニュアルH1N1新型インフルエンザ2009年5月 ver.1、2009
- 6) 国立感染症研究所感染症情報センター：インフルエンザ2008/09シーズン、IASR、30(11)、2009
- 7) 国立感染症研究所感染症情報センター：2008/09インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ(A/H1N1)オセルタミビル耐性株(H275Y)の国内発生状況[第1報]、IASR、30(2)、49-53、2009
- 8) 国立感染症研究所感染症情報センター：〈速報〉新型インフルエンザ(A/H1N1pdm)オセルタミビル耐性株(H275Y)の国内発生状況[第2報]、IASR、31(6)、173-178、2010
- 9) 国立感染症研究所感染症情報センター：インフルエンザウイルス(季節性+AH1pdm)分離・検出速報 2009/10シーズン、IASR HP、2010