

2014/15 シーズンの大阪市における季節性インフルエンザウイルスの分離状況

久保英幸、改田 厚、入谷展弘、山元誠司、西尾孝之

Seasonal Influenza Viruses Isolated in Osaka City, 2014/15 Influenza Season

Hideyuki KUBO, Atsushi KAIDA, Nobuhiro IRITANI, Seiji P YAMAMOTO,
and Takayuki NISHIO

Abstract

The 2014/15 influenza season in Osaka City began and peaked about a month earlier than average. These timings also seemed to be earlier than other regions, as compared with influenza data in Japan. The dominant influenza virus in isolation was subtype AH3, and occupied 90.2 %. The rest 9.8 % were type B/Yamagata. Subtype AH1pdm09 and type B/Victoria were not isolated in this season. Continuous surveillance concerning influenza activity and the virus circulation is important for calling the attentions to prevent the virus infection as well as medicating properly.

Key words: seasonal influenza viruses, subtype AH3, type B/Yamagata

I 緒言

インフルエンザウイルスは、ヒトに呼吸器系疾患を引き起こす原因ウイルスで、世界的規模での大流行が毎年認められている。本ウイルスによる感染症、すなわちインフルエンザ様疾患(インフルエンザ)の流行は、温帯地域においては通常冬季に発生し、その流行の規模や持続期間は、国・地域および各インフルエンザシーズン(流行シーズン:北半球では 11 月から翌年 4 月まで)によって様々な様相を呈する。また、インフルエンザによる死亡者数は、全世界で毎年数百万人規模に達していることから、最重要感染症の一つに位置付けられている[1, 2]。ヒトの季節性インフルエンザウイルスは A および B 型に分類され、A 型には A (H1N1) pdm2009 (AH1pdm09) および A (H3N2) (AH3) の 2 亜型が、B 型には Yamagata (B/Yamagata) および Victoria (B/Victoria) の 2 系統が存在している[3, 4]。これらの型・亜型のうち、主流となるものはシーズン毎に異なることから、次シーズンの主流となる季節性インフルエンザウイルスの型・亜型を予測することは、現在のところ不可能となっている[5-8]。

季節性インフルエンザウイルスの感染予防および軽症化には、インフルエンザワクチンの接種が最も有効とされ、流行シーズン開始前のワクチン接種の推奨が毎年実施されている。インフルエンザウイルスの特徴として、主要タンパク質である赤血球凝集素タンパク質の抗原変異が容易に生じることが報告されている。この現象

により、以前に体内で産生された中和抗体の効果が消失してしまい、そしてこれが毎年のインフルエンザ流行発生の要因になるとされている[9]。また、このことが、インフルエンザワクチンの繰り返し接種が推奨される理由となっている。当該インフルエンザシーズンの主流となっているインフルエンザウイルスの型・亜型およびその抗原性状をタイムリーに把握し、その情報を医療機関等に迅速に提供することは、当疾患治療およびその感染拡大予防対策上、重要なことである。

当所では、大阪市感染症発生動向調査事業として、インフルエンザ疑患者検体からのインフルエンザウイルスの分離・同定試験を実施し、得られた結果について、関連行政機関への情報還元を行うとともに、分離インフルエンザウイルスに関する性状解析を実施している。

II 実験

1) 季節性インフルエンザウイルスの分離

大阪市感染症発生動向調査事業およびインフルエンザ集団発生(学級閉鎖)事例検査に供与されたインフルエンザ患者検体(咽頭ぬぐい液、鼻汁およびうがい液)をイヌ腎上皮細胞由来の MDCK 細胞に接種した後、温度を 35 °C、CO₂ 濃度を 5.0 % に設定したインキュベーター(エスベック)内での培養を行った。細胞培養液には、0.2 % ウシ血清アルブミンおよび 0.25 % トリプシンを添加したイーグル MEM 培地(ライフテクノロジー)を使用した。細胞変性効果(CPE)の出現観察を

最長 2 週間行い、この観察期間内で CPE の認められた検体をインフルエンザウイルス分離陽性と判定し、培養上清を採集してウイルス保存液とした。

2) 分離株の型・亜型同定

各分離株のウイルス保存液および 0.75 %モルモット血球(コスモバイオ)を用いて赤血球凝集(HA)試験を行い、HA 価を測定した。得られた HA 価に基づいて各株のウイルス保存液を一定濃度に希釈し、この希釈液および国立感染症研究所から分与された『2014/15 シーズンインフルエンザウイルス(AH1pdm09, AH3, B) 同定用キット』を用いて赤血球凝集阻止(HI)試験を行い、分離株の型・亜型の同定および HI 価の測定を行った[10]。また、HI 試験を行うために必要な HA 価を示さなかった分離株に対しては、ウイルス RNA 抽出キット(キアゲン)を用いて、ウイルス保存液から RNA を抽出した後に、リアルタイムまたはコンベンショナル RT-PCR を行い、型・亜型を同定した[11]。

III 結果

1) 2014/15 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス株の型・亜型

本シーズンに大阪市内で採取されたインフルエンザ患者の検体数は 192 であった。最初の検体は 2014 年 8 月 23 日に採取された。9 および 10 月は、それぞれ 3 および 1 検体が採取された。その後 11 月の検体数は 39 となって一気に増加し、12 月は 70 検体でピークとなった。その後 1 月に 35 検体、2 月に 19 検体、および 3 月に 24 検体が採取され、4 月以降は採取されなかった。また、大阪市のインフルエンザ発生状況は、12 月下旬(52 週)～1 月上旬(1 週)がピークとなった。その後 1 月下旬まで定点あたりの患者数は 15 人以上であったが、2 月上旬以降急激な患者数の減少が認められた[12]。本シーズンに分離されたインフルエンザウイルス株数は 102 であった。各月の分離株数は、9 月に 2 株、10 月に 1 株、その後 11 月から 3 月までは、それぞれ 21、24、27、13 および 14 となった(表 1)。各月に分離されたインフルエンザウイルスの型・亜型数を表 2 に示した。本シーズンは AH3 および B/Yamagata のみの、計 102 株が分離された。このうち、AH3 が 92 株で全体の 90.2 %を占めた。AH3 は 9～3 月の期間に分離され、特に 11～1 月の分離数が多かった。また、B/Yamagata

は 1 月以降に 10 株が分離され、このうちの 8 株が 3 月に分離された。

2) 各分離インフルエンザウイルス株の HA 価

2014 年 9 月から 2015 年 3 月の期間に分離された各株に対して、0.75 %モルモット血球を用いた HA 試験を行い、各株の HA 価を測定した。分離 AH3 株のうちの 35 株(38.0 %)の HA 価は 2 未満となり、39 株(42.4%) のものは 2～8 となった。残りの 18 株(19.6 %)の HA 価は、HI 試験実施可能な 16 以上となった(表 3)。分離 B/Yamagata の HA 価は、128 が 7 株、256 が 2 株、および 512 が 1 株であった(表 4)。

3) 各分離インフルエンザウイルス株の HI 価

16 以上の HA 価を示した株に対しては、『2014/15 シーズンインフルエンザウイルス(AH1pdm09, AH3, B) 同定用キット』を用いて、引き続き HI 試験を実施してその価を測定した。本試験対象となった 18 株の AH3 の HI 価は、80 が 4 株、160 が 11 株、320 が 3 株であった。また、AH3 コントロール抗原(同定キットに同梱され、ワクチン株を不活化したもの)での HI 価は 2,560 であった(表 5)。B/Yamagata では、全 10 株の HI 価が 40 となり、このコントロール抗原での値は 320 となった(表 6)。

IV 考察

2014/15 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザ患者数の増加は、10 月下旬(43 週)から認められ始めたが、これは例年に比べて約 1 ヶ月早いものとなった。また、流行のピークは 12 月下旬(52 週)および 1 月上旬(1 週)となり、これも例年に比べて約 1 ヶ月早いものとなった[12]。この状況は、市内 24 区のインフルエンザ学級閉鎖初発例において顕著に認められた。表 7 に過去 3 シーズンの市内各区のインフルエンザ学級閉鎖初発月別数を示した。これまでの各区学級閉鎖初発例は 1 月に集中したのに対し、本シーズンにおいては 11 および 12 月に集中した。なお、近隣府県の大阪府、京都府および兵庫県における流行開始時期は、それぞれ 45、48 および 45 週、流行のピークは、それぞれ 52、52 および 2 週であった[13-15]。また、全国レベルで解析された流行開始時期は 11 月下旬(47 週)、流行のピークは 1 月中～下旬(2～4 週)であった[16]。以上のことから、本シーズンにおける大阪市内でのインフ

表 1 2013/14 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザウイルス月別採取検体数および分離・検出陽性数

| | 検体採取月 | | | | | | | | 計 |
|-------|--------|---|----|----|----|--------|----|----|-----|
| | 2014.8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 2015.1 | 2 | 3 | |
| 採取検体数 | 1 | 3 | 1 | 39 | 70 | 35 | 19 | 24 | 192 |
| 分離陽性数 | - | 2 | 1 | 21 | 24 | 27 | 13 | 14 | 102 |

表 2 2013/14 シーズンに大阪市内において分離されたインフルエンザウイルスの各型・亜型数

| 型・亜型 | 検体採取月 | | | | | | | 計 |
|------------|--------|----|----|----|--------|----|---|----|
| | 2014.9 | 10 | 11 | 12 | 2015.1 | 2 | 3 | |
| AH3 | 2 | 1 | 21 | 24 | 26 | 12 | 6 | 92 |
| B/Yamagata | - | - | - | - | 1 | 1 | 8 | 10 |

表 3 分離 AH3 株の各 HA 価を示した株数

| HA 価 | 検体採取月 | | | | | | | 計 |
|------|--------|----|----|----|--------|---|---|----|
| | 2014.9 | 10 | 11 | 12 | 2015.1 | 2 | 3 | |
| <2 | - | - | 4 | 6 | 13 | 7 | 5 | 35 |
| 2 | - | - | 4 | 6 | 6 | 3 | 1 | 20 |
| 4 | 2 | - | 6 | 4 | 1 | 1 | - | 14 |
| 8 | - | - | 1 | 3 | 1 | - | - | 5 |
| 16 | - | - | - | 1 | - | 1 | - | 2 |
| 32 | - | - | 3 | 2 | 4 | - | - | 9 |
| 64 | - | 1 | 3 | 2 | 1 | - | - | 7 |

表 4 分離 B/Yamagata 株の各 HA 価を示した株数

| HA 価 | 検体採取月 | | | 計 |
|------|--------|---|---|---|
| | 2015.1 | 2 | 3 | |
| 128 | 1 | - | 6 | 7 |
| 256 | - | 1 | 1 | 2 |
| 512 | - | - | 1 | 1 |

表 5 分離 AH3 株の各 HI 価を示した株数

| HA 価 | 検体採取月* | | | | | 計 |
|------|---------|----|----|--------|---|----|
| | 2014.10 | 11 | 12 | 2015.1 | 2 | |
| 80 | - | - | 2 | 1 | 1 | 4 |
| 160 | - | 4 | 3 | 4 | - | 11 |
| 320 | 1 | 2 | - | - | - | 3 |

コントロール抗原に対する HI 価: 2,560

*: HI 試験実施可能株の採取された月のみ記載

ルエンザの流行は、その開始時期は近隣府県および全国と比較して早い傾向にあったこと、また、流行のピークは近隣府県とともに全国よりも早い傾向にあったことが示唆された。

本シーズンに大阪市内で分離・同定されたインフルエンザウイルスは、AH3 および B/Yamagata のみで、その比率はそれぞれ 90.2 および 9.8 % となった(表 2)。AH3 が主流となったのは 2 シーズンぶりであった。また、昨シーズンの主流であった AH1pdm09 が分離されなかったのは 3 シーズンぶり、さらに B/Victoria が分離されなかったのは 4 シーズンぶりであった[17-19]。本シーズンの全国におけるインフルエンザウイルスの分離・同定株数は、AH3、B/Yamagata、AH1pdm09、および B/Victoria の順に多く、その比率はそれぞれ 87.2、10.9、1.0 および 0.9 % となった[20]。このことから、全国的にも大阪市の場合と同様に AH3 が主流となり、その他として B/Yamagata が 10 % 程度であったことが明らかとなった。

表 6 分離 B/Yamagata 株の HI 価 40 を示した株数

| HI 価 | 検体採取月 | | | 計 |
|------|--------|---|---|----|
| | 2015.1 | 2 | 3 | |
| 40 | 1 | 1 | 8 | 10 |

コントロール抗原に対する HI 価: 320

分離された季節性インフルエンザウイルスの同定に用いられる HI 試験は、各ウイルスの抗原解析についても実施可能である[10]。今シーズンの分離株のうち、HI 試験が可能となった株の HI 価は、すべてコントロール抗原の 8 倍以上の低下を示したことから(表 5 および 6)、定義上これらの分離株はワクチン株の抗原変異株にあてはまる[21]。しかし、現在のインフルエンザウイルス同定キットに使用されている抗ウサギ血清では、詳細な抗原解析は不可能であるとされ、得られた HI 価は参考程度とすることが妥当とされている [19, 22]。なお、2014/15 シーズンの北半球で分離された AH3 株の大半は、詳細な抗原解析が可能とされる抗フェレット血清を用いた HI 試験の実施が困難となる生物学的性状の変化が認められること、さらに HI 試験の代替法として実施したウイルス中和試験の結果から、ワクチン株の抗原変異株であることが報告され、また、同シーズンに分離

表 7 過去 3 シーズンの大阪市内各区インフルエンザ様疾患学級閉鎖初発月別数

| シーズン | 月 | | | | | | 計 |
|---------|---|----|----|----|----|---|----|
| | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | |
| 2012/13 | - | - | 1 | - | 22 | 1 | 24 |
| 2013/14 | - | - | - | 1 | 23 | - | 24 |
| 2014/15 | 1 | - | 5 | 17 | 1 | - | 24 |

された B/Yamagata に関しては、ほぼすべてがワクチン株の抗原類似株であることが報告されている[23]。

季節性インフルエンザウイルスは、南北両半球の諸地域において毎年冬季に世界的流行を引き起こし、その流行状況に関しては、世界保健機関を始めとする関係諸機関が発信するホームページなどを介して、時宜を得た情報提供が行われている[24-26]。2014 年の南半球でのインフルエンザシーズン(5～10 月)の主流となったインフルエンザウイルスは、次の通り報告されている: 南米諸国; AH3、熱帯南米諸国; AH3 が大半(AH1pdm09 および B 型との混合流行)、中南米およびカリブ海諸国; B 型、南アフリカ; AH3、オーストラリア; AH1pdm09 (ただし、2 行政区域では AH3)、ニュージーランド; AH1pdm09 [27]。また、これに引き続き北半球での流行シーズン(2014 年 11 月～2015 年 4 月)における各地域の主流は、次の通り報告されている: 北米諸国; AH3、ヨーロッパ諸国; AH3、アフリカ諸国; B 型、中央・西アジア諸国; AH1pdm09、東アジア諸国; AH3、熱帯アジア諸国; AH1pdm09、AH3、B 型(国・地域により異なる)[28]。主流となるインフルエンザウイルスの型・亜型に関しては、上記に示した各地域、さらに各シーズンによる相違が毎年繰り返して認められていることから、次シーズンの主流となる型・亜型を予測することは不可能とされている。流行および患者発生数の規模から、最重要感染症とされる季節性インフルエンザウイルスの流行状況を迅速・的確に把握し、さらにそれに対する情報提供および啓発を行って、インフルエンザの発症予防策および流行抑制策を講じることは、公衆衛生行政上重要であるものと思われる。

V 結論

2014/15 シーズンの大阪市内におけるインフルエンザは、流行開始時期および流行ピークともに、例年より 1 ヶ月程度早かった。また、この状況は、全国的に見ても早い傾向であることが示唆された。分離されたインフルエンザウイルスは AH3 が 90.2 % で主流となり、また、B/Yamagata が 9.8 % となった。AH1pdm09 および B/Victoria は分離されなかった。今後も引き続きインフルエンザウイルスの流行状況をタイムリーに把握し、その情報提供および啓発を行うことが重要である。

謝辞 本研究における臨床検体の採取および諸連絡などに関しまして、ご協力をいただきました関連諸機関の皆様に、深謝いたします。

参考文献

- 1) Cox NJ, and Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med.* 2000; 51: 407-421.
- 2) Hilleman MR. Realities and enigmas of human influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002; 20: 3068-3087.
- 3) World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014 southern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec.* 2014; 89: 441-456.
- 4) World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015; 90: 97-108.
- 5) 国立感染症研究所, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 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. 2010/11 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. *病原微生物検出情報* 2011; 32: 317-323.
- 6) 国立感染症研究所, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 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. 2011/12 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. *病原微生物検出情報* 2012; 33: 288-294.
- 7) 国立感染症研究所, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 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. 2012/13 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. *病原微生物検出情報* 2013; 34: 328-334.
- 8) 国立感染症研究所, 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. 2013/14 シーズンのインフルエンザ分離株の解析. *病原微生物検出情報* 2014; 35: 254-258.
- 9) Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe Jr JE, and Wilson IA. Structural basis of pre-existing immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* 2010; 328: 357-360.
- 10) 国立感染症研究所. インフルエンザ診断マニュアル: 平成 26 年 9 月. 第 3 版. 国立感染症研究所; 2014.
- 11) 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ: 2009 年 11 月. ver.2. 国立感染症研究所; 2009.
- 12) 大阪市, 大阪市インフルエンザ発生状況, http://www.city.osaka.lg.jp/kenko/page/000010107_0.html (2015/7/10).
- 13) 大阪府感染症情報センター, インフルエンザ関連情報, <http://www.iph.pref.osaka.jp/infection/influ/shingata.html> (2015/7/10).

- 14) 京都府感染症情報センター, 感染症情報(週報), <http://www.pref.kyoto.jp/idsc/> (2015/7/10).
- 15) 兵庫県感染症情報センター, 兵庫県感染症発生動向調査週報, <http://www.hyogo-iphes.jp/kansen/infectdis.htm> (2015/7/10).
- 16) 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局結核感染症課. 今冬のインフルエンザについて: 2014/15 シーズン; 2015年5月14日.
- 17) 久保英幸, 改田 厚, 入谷展弘, 関口純一郎. 大阪市における 2011/12 シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析. 大阪市立環科研報告 2012; 74: 1-4.
- 18) 久保英幸, 改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 長谷篤. 2012/13 シーズンに大阪市で分離されたインフルエンザウイルスの解析. 大阪市立環科研報告 2013; 75: 11-17.
- 19) 久保英幸, 改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 長谷篤, 西尾孝之. 2013/14 シーズンに大阪市内で分離された季節性インフルエンザウイルス. 大阪市立環科研報告 2014; 76: 1-6.
- 20) 国立感染症研究所, 週別インフルエンザウイルス分離・検出報告数: 2009/10~2013/14 シーズン, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-inf.html> (2015/7/10).
- 21) Ann J, Papenburg J, Bouhy X, Rheume C, Hamelin ME, and Bolvin G. Molecular and antigenic evolution of human influenza A/H3N2 viruses in Quebec, Canada, 2009-2011. *J Clin Virol.* 2012; 53: 88-92.
- 22) 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. 2012/13 シーズンインフルエンザウイルス (A/H1pdm09、AH3、B)同定用キットの送付について; 2012年10月15日.
- 23) World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season, 2015.2.26
- 24) World Health Organization, Influenza, <http://www.who.int/influenza/en/> (2015/7/10).
- 25) Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS), EpiFlu, <http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#22bef3> (2015/7/10).
- 26) 国立感染症研究所感染症疫学センター, インフルエンザ, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-inf.html8> (2015/7/10).
- 27) World Health Organization. Review of the 2014 influenza season in the southern hemisphere. *Wkly Epidemiol Rec.* 2014; 48: 529-544.
- 28) World Health Organization, Influenza updates, http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en/ (2015/7/10).