

原 著

過去 5 シーズンにおけるインフルエンザ非流行期と流行期に分離された AH3 亜型インフルエンザウイルスの遺伝子学的相関性 -三重県 (2012/13~2016/17 シーズン)

矢野拓弥, 赤地重宏

**Genetic correlation between AH3 subtype influenza viruses isolated during non-epidemic period and epidemic period in past 5 seasons in Mie prefecture
(2012/13 season - 2016/17 season)**

Takuya YANO and Shigehiro AKACHI

三重県内において過去5シーズン (2012年第36週~2017年第13週) の間に分離されたAH3亜型インフルエンザウイルス (AH3亜型ウイルス) についてHemagglutinin (HA) 遺伝子の解析を実施し、非流行期および流行期の同ウイルスに関して遺伝子学的な差異を調査した。

今回、解析した各シーズンにおける非流行期のAH3亜型ウイルスは、流行期に主流行していたAH3亜型ウイルスと近縁なウイルスであった。このことから、流行期だけでなく非流行期においても積極的な調査を実施し、ウイルスの遺伝子特性を明らかにすることで、流行期に主流となるウイルスの早期把握が可能となることが示唆された。

キーワード : AH3 亜型インフルエンザウイルス, 遺伝子解析, 非流行期

はじめに

我が国における季節性インフルエンザの流行パターンは、晩秋から初冬に患者が報告されはじめ、冬季に流行のピークに達し、春先に終息となるのが一般的である^{1,2)}。一方、沖縄県では、インフルエンザの非流行期である夏季に流行が確認されたことがあり^{3,4)}、年によっては国内における流行には地域差がみられる。

インフルエンザウイルス抗原性状の変化は、流行動態および流行規模に密接な関係がある。

そこで我々は本県において過去 5 シーズンの間に分離された AH3 亜型インフルエンザウイルス (AH3 亜型ウイルス) についてヘマグルチニン (Hemagglutinin : HA) 遺伝子解析を実施し、検出時期別 (非流行期と流行期) の本ウイルスの遺伝子学的相関性について検討したので以下に報告する。

対象と方法

1. 調査対象

三重県感染症発生動向調査事業において、2012 年第 36 週~2017 年第 13 週の間に県内の医療機関を受診し、主としてインフルエンザと診断された患者 435 名から採取した呼吸器由来の臨床検体を用いて季節性インフルエンザウイルス調査を実施した。採取シーズン別の検査数は 2012/13 シーズン 90 名、2013/14 シーズン 97 名、2014/15 シーズン 64 名、2015/16 シーズン 94 名、2016/17 シーズン (2017 年第 13 週まで) 90 名であった。

なお、調査対象者の臨床情報および臨床検体の使用に関しては三重県感染症発生動向調査事業における病原体検査指針に従い、調査対象者または保護者による承諾書への署名を得た。検査依頼医療機関記入の調査票 (患者情報) の使用にあたっては、倫理的配慮として、個人情報保護等に留意し実施した。

Table1 Number of Influenza viruses positive patients (week 36/2012~week 13/2017)

Influenza virus	Number of positive patients												Total (%)
	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	
Influenza virus A(H1N1pdm09)	34	25	16	2	2	0	0	0	4	0	0	2	85(20.8)
Influenza virus A(AH3 subtype)	80	39	22	6	2	2	2	5	2	3	14	26	203(49.6)
Influenza virus B	26	31	32	18	4	0	0	0	0	1	0	5	117(28.6)
Influenza virus A and B	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4(1)
Total (%)	141(34.5)	96(23.5)	72(17.6)	26(6.4)	8(2)	2(0.5)	2(0.5)	5(1.2)	6(1.5)	4(1)	14(3.4)	33(8.1)	409

2. インフルエンザウイルスの分離

ウイルス分離には MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞を用いた。分離のために同細胞を 24 ウェルの培養用プレートを用いて CO₂ インキュベーター内で 34°C, 3~4 日間単層培養した後、臨床検体 0.1ml を接種後、60 分間吸着後にトリプシン添加分離用培地を 1ml 加えた。その後、6~7 日間のウイルス培養を行い、倒立顕微鏡下において細胞変性効果の有無を観察した⁵⁾。

3. インフルエンザウイルスの検出および亜型同定試験

インフルエンザウイルスの亜型同定には、分離株および臨床検体から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、Conventional RT-PCR 法および Real-Time RT-PCR 法による HA 遺伝子検査⁵⁾にて季節性インフルエンザウイルスの亜型同定を行った。

4. HA 遺伝子系統樹解析

分離あるいは検出された AH3 亜型ウイルスについて、HA 遺伝子の塩基配列を決定し遺伝子系統樹解析を実施した⁵⁾。遺伝子系統樹解析には、塩基配列解析ソフトウェア Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5 を用いた。遺伝子系統樹作成には、近隣結合法 (Neighbor-Joining : NJ 法) により行った。Bootstrap test は 1,000 回行った。

結果

1. インフルエンザウイルスの分離・検出数

患者 435 名から採取された臨床検体を用いて季節性インフルエンザウイルスの分離・検出を実施したところ、409 名が季節性インフルエンザウイルス陽性となった。型別の内訳は、AH3 亜型ウイルス 203 名 (49.6%) で最も多く、次いで B 型インフルエンザウイルス 117 名 (28.6%)、AH1pdm09 ウイルス 85 名 (20.8%) の順であった。その他 A 型インフルエンザウイルスおよび B 型インフルエンザウイルスの

Table2 AH3 subtype influenza viruses (non-epidemic, epidemic) isolated in Mie prefecture (2012/13~2016/17 season)

Season	Subclass of non-epidemic virus strain (Sample collection date)		Subclass of epidemic virus strain	Vaccine strain (Subclade)
2012/13	Subclade3C	(December 2012)	Subclade3C	A/Victoria/361/2011 (Subclade3C)
2013/14	Subclade3C 2	(November 2013)	Subclade3C 2 Subclade3C 3	A/Texas/50/2012 (Subclade3C 1)
2014/15	Subclade3C 2a	(September 2014)	Subclade3C 2a Subclade3C 3a	A/New York/39/2012 (Subclade3C 3)
2015/16	Subclade3C 2a	(October 2015)	Subclade3C 2a	A/Switzerland/9715293/2013 (Subclade3C 3a)
2016/17	Subclade3C 2a	(October 2016)	Subclade3C 2a Subclade3C 2a1	A/Hong Kong/4801/2014 (Subclade3C 2a)

- The early 2012/13 season isolate
- Mie Prefecture isolates(2012/13 season)
- △ Mie Prefecture isolates(2011/12 season)
- ◇ Vaccine strain

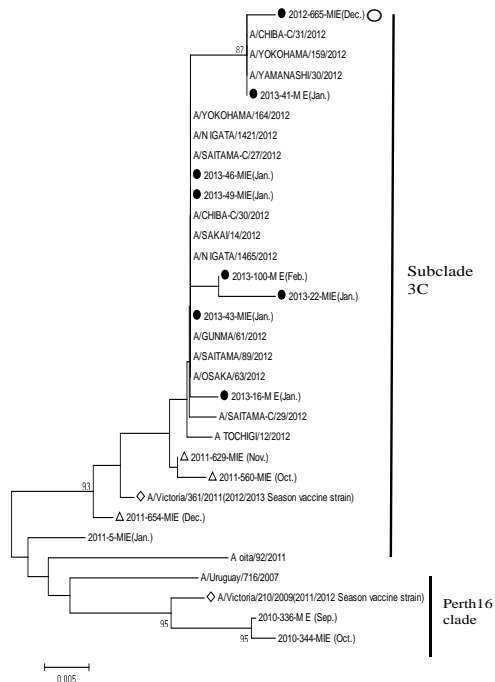


Fig1. Phylogenetic trees for the HA gene of A/H3N2 viruses (2012/13 season)

- The early 2013/14 season isolate
- Mie Prefecture isolates(2013/14 season)
- △ Mie Prefecture isolates(2012/13 season)
- ◇ Vaccine strain

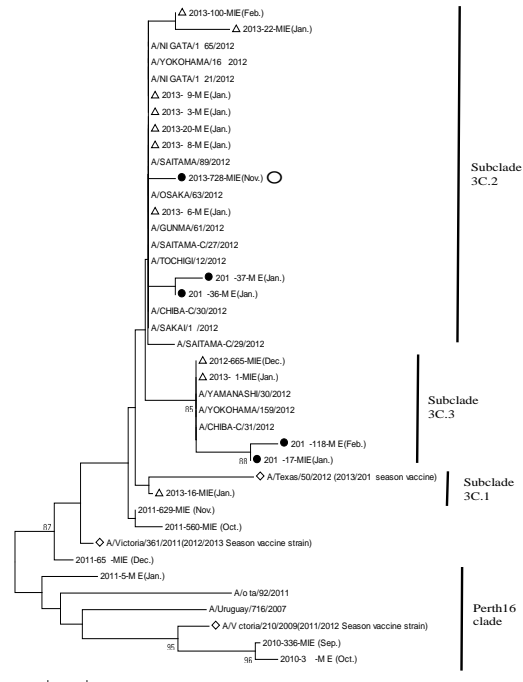


Fig2. Phylogenetic trees for the HA gene of A/H3N2 viruses (2013/14 season)

両方が陽性となった者が 4 名 (1%) であった (Table1) .

月別の季節性インフルエンザウイルス陽性数は、1 月が 141 名 (34.5%) で最も多く、次いで 2 月 96 名 (23.5%) , 3 月 72 名 (17.6%) , 12 月 33 名 (8.1%) の順であった (Table1) .

2. 各シーズン別の AH3 亜型ウイルスの HA 遺伝子の Subclade 分類および系統樹解析

各シーズン別の AH3 亜型ウイルスの HA 遺伝子の Subclade 分類 (非流行期, 流行期) および同亜型ウイルスの HA 遺伝子系統樹解析を実施した (Table2, Fig.1-5) .

各シーズン (非流行期, 流行期) に分離された AH3 亜型ウイルスの特徴的なアミノ酸置換を以下に示した.

1) 2012/13シーズン

2012年12月 (非流行期) に分離されたAH3亜型ウイルスは, Subclade3C (S45N, T48I, N145S) に分類された.

流行期に分離された同亜型ウイルスも同じSubclade3Cに属し, 主流行していた.

なお, 2012/13シーズンのワクチン株のA/Victoria/361/2011は, 流行ウイルスと同じ

Subclade3Cに属しており, 類似ウイルスであった (Fig.1) .

2) 2013/14シーズン

2013年11月 (非流行期) に分離されたAH3亜型ウイルスは, Subclade3C.2 (L3I, N144S, N145S, F159Y, K160T, N255D, Q311H, D489N) に分類された.

流行期に分離された同亜型ウイルスは, Subclade3C.2 および Subclade3C.3 (T128A, R142G, N145S) の2種類のSubcladeのウイルスが確認された.

なお, 2013/14シーズンのワクチン株のA/Texas/50/2012は, Subclade3C.1に属しており, 流行ウイルスと比較し差異がみられた (Fig.2) .

3) 2014/15シーズン

2014年9月 (非流行期) に分離したAH3亜型ウイルスは, Subclade3C.2a (L3I, Q33R, N144S, F159Y, K160T, N225D, N278K, Q311H, D489N) に分類された.

流行期に分離した同亜型ウイルスの多くがSubclade3C.2aに属していたが, Subclade3C.3a (A138S, F159S, N225D) に属するウイルスも少数ながら確認された.

- The early 2014/15 season isolate
- Mie Prefecture isolates (2014/15 season)
- △ Mie Prefecture isolates (2013/14 season)
- ◇ Vaccine strain

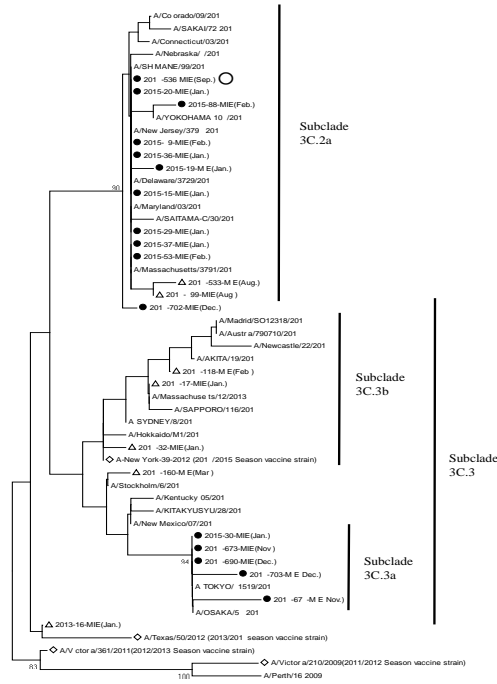


Fig3. Phylogenetic trees for the HA gene of A/H3N2 viruses (2014/15 season)

なお、2014/15シーズンのワクチン株の A/New York/39/2012は、Subclade3C.3に属しており、シーズン初期に分離された本ウイルスと比較し差異がみられた (Fig.3)。

4) 2015/16シーズン

2015年10月 (非流行期) に分離したAH3亜型ウイルスは、昨シーズンの流行期のウイルスと類似のSubclade3C.2aに属するウイルスであった。

流行期に分離した同亜型ウイルスは、同じくSubclade3C.2aに属するウイルスが主流であった。

なお、2015/16シーズンのワクチン株の A/Switzerland/9715293/2013は、非流行期と同じSubclade3C.3aに属しており、流行ウイルスと比較し差異がみられた (Fig.4)。

5) 2016/17シーズン

2016年10月 (非流行期) に分離したAH3亜型ウイルスは、Subclade3C.2aに分類された。

流行期に分離したAH3亜型ウイルスは、Subclade3C.2aに属し、同Subclade内でさらにアミノ酸置換 (N171K, I406V, G484E) を有するSubclade3C.2a1に分類されるウイルスが主流であった。

- The early 2015/16 season isolate
- Mie Prefecture isolates (2015/16 season)
- △ Mie Prefecture isolates (2014/15 season)
- ◇ Vaccine strain

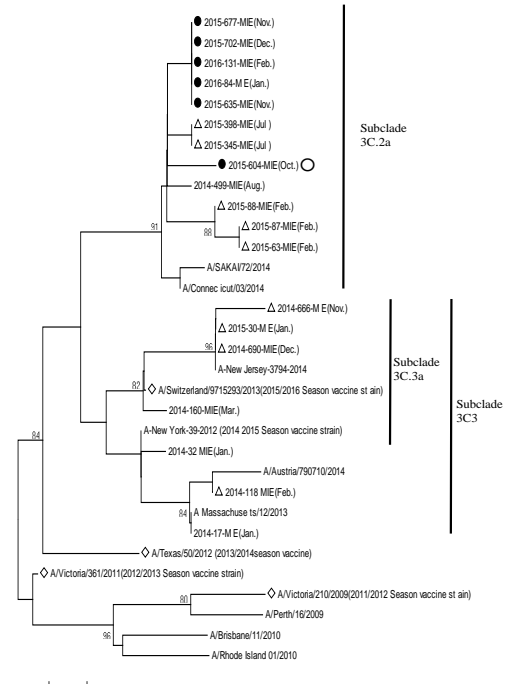


Fig4. Phylogenetic trees for the HA gene of A/H3N2 viruses (2015/16 season)

なお、2016/17シーズンのワクチン株の A/Hong Kong/4801/2014は、Subclade3C.2aに属しており、Subclade3C.2a1に属する流行ウイルスと比較し差異がみられた (Fig.5)。

考 察

季節性インフルエンザウイルスは急性呼吸器感染症のため幅広い年齢層で罹患する。特に高齢者では重症化しやすく、肺炎などの合併症により重篤な経過をとり、死因となりうる事が報告されている⁶⁻¹⁰⁾。

今回、2012年第36週～2017年第13週の間の本県で非流行期と流行期に分離されたAH3亜型ウイルスを用いて、HA遺伝子系統樹解析を実施し、相関性を検討するためにSubclade分類を実施した。

各シーズンの初期 (非流行期) に分離されたAH3亜型ウイルスと流行期に分離された同亜型ウイルスのアミノ酸配列を比較した結果、各シーズンの初期に患者から分離されAH3亜型ウイルスのSubcladeは、その後の主流期に分離された同亜型ウイルスと同じSubcladeを形成する傾向がみられた。本県では2014年8月に高齢者福祉施設内で季節性インフルエンザウイルスによる集団感染事例¹¹⁾が発生したが、本事例から分離されたAH3亜型ウイルスは、次

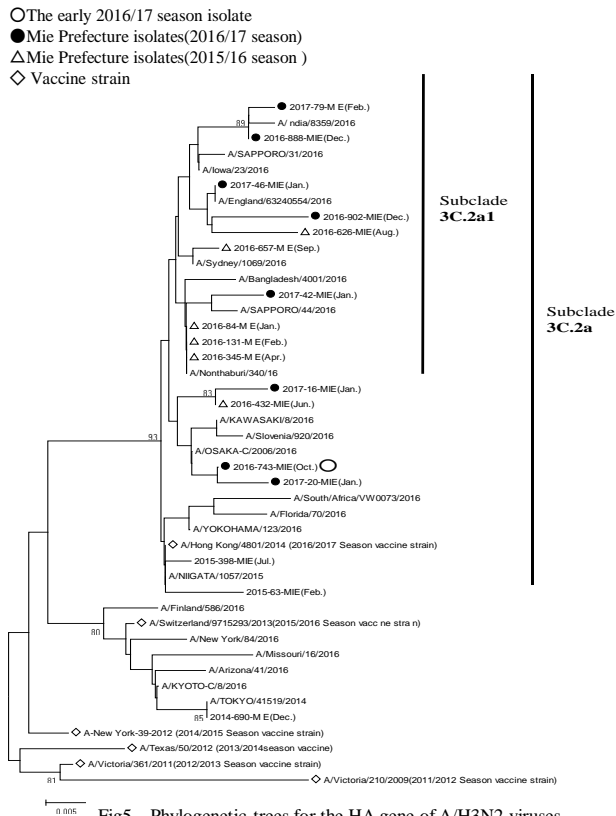


Fig5 Phylogenetic trees for the HA gene of A/H3N2 viruses (2016/17 season)

シーズンの冬季に確認された流行ウイルスと同Subcladeであった。さらに我々是非流行期に海外渡航歴を有する患者が季節性インフルエンザウイルス陽性となるケースを複数例^{12, 13)}で経験しており、夏季などの非流行期に積極的な調査を実施することは、次期に主流となるウイルスの早期把握に繋がること示唆された。

一方で各シーズンのワクチン株と同一シーズンに分離されAH3亜型ウイルスの比較では、同一のSubcladeの場合もあるが、遺伝子の変異により異なるアミノ酸配列を有するAH3亜型ウイルスが主流となる傾向がみられ、迅速的な情報還元が必要である。我々は、これまでにエビデンスとなる検査情報を継続的に蓄積し、その情報を基に本県の感染症対策に活用可能な情報を迅速に発信することに努め報告¹¹⁻¹⁶⁾してきたが、通年におけるインフルエンザ検体の収集が困難であったため、断片的な情報発信に留まっていた。平成28年4月1日から施行された感染症法の改正より、全ての感染症の検査に必要な検体等の確保が保障され、感染症に関する検査、情報収集体制が強化された。特に国内で流行している季節性インフルエンザウイルスの疫学調査の充実を図ることが規定され、都道府県等がインフルエ

ンザウイルスの検査検体の提出を担当する提出医療機関を指定し、非流行期は月に1検体以上、流行期には毎週1検体以上を提出することが明示された¹⁷⁾。このことにより、国内の季節性インフルエンザウイルスのサーベイランス体制が整備され、調査の質および情報発信の向上となるものと期待される。これらの季節性インフルエンザサーベイランス体制の確立は、非流行期のウイルス株と流行期のウイルス株との相同性の早期把握に繋がるものである。こうした非流行期に得られた知見についての情報発信を行う取り組みは、行政的な観点における感染予防対策においても公衆衛生の向上に寄与できるものと考えられる。

謝 辞

本調査研究を行うにあたり、三重県感染症発生動向調査事業で検体採取を担当された医療機関の諸先生方および保健所等、関係各位にお礼申し上げます。

本研究の一部は加藤岡三文化振興財団の研究助成を受けて実施したものである。

文 献

- 1) 過去10年間との比較グラフ (週報：インフル

- エンザ)
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/10/2096-weeklygraph/1644-01flu.html>
- 2) インフルエンザ 保健所管内別・週別定点当たり患者届出数
<http://www.kenkou.pref.mie.jp/topic/influ/influhyoumenu.htm>
 - 3) 平良勝也, 仁平 稔, 糸数清正 他: 夏季におけるAH3型インフルエンザウイルスの流行—沖縄県, 病原微生物検出情報, **26**, 243-244 (2005).
 - 4) 久場由真仁, 喜屋武向子, 高良武俊 他: 2013/14シーズンにおけるインフルエンザウイルスの流行—沖縄県, 病原微生物検出情報, **35**, 262-263 (2014).
 - 5) 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26年9月.
 - 6) Goodman RA, Orenstein WA, Munro TF, Sikes KS: Impact of influenza A in a nursing home. *JAMA*; **247**, 1451-1453. (1982) .
 - 7) 加地正郎: 高齢者におけるかぜ症候群, 臨床とウイルス **15**, 296-299 (1987).
 - 8) Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J et al . : An outbreak of influenza A (H3N2) in a hospital for the elderly with emphasis on pulmonary complications, *Jpn J Med* **27**, 177-182 (1988).
 - 9) 山腰雅宏, 山本俊信, 鈴木幹三, 他: 急性筋炎を認めた高齢者インフルエンザ(A型)の4例, 感染症誌 **69**, 752-756 (1995).
 - 10) 鍋島篤子, 池松秀之, 山家 滋, 他: 高齢者におけるインフルエンザについての研究: 1992年度院内流行の解析, 感染症誌 **69**, 801-806 (1996).
 - 11) 矢野拓弥, 前田千恵, 赤地重宏 他: 2013年9月に分離されたA(H1N1)pdm09ウイルスの性状-三重県, 病原微生物検出情報, **34**, 343-345 (2013).
 - 12) 矢野拓弥: オセルタミビル投与の小児患者から検出された耐性A (H1N1) pdm09ウイルスの検討, 小児感染症疫 **25**(3), 289-296(2013).
 - 13) 矢野拓弥, 高下恵美, 江島美穂 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検出された抗インフルエンザ薬耐性A (H1N1) pdm09ウイルス, 三重保環研年報 第16号 (通巻第59号), 35-41(2014).
 - 14) 矢野拓弥, 原 有紀, 植嶋一宗 他: インフルエンザ非流行期に高齢者福祉施設内における集団感染事例から検出されたAH3亜型インフルエンザウイルスのウイルス学的解析-三重県 (2014年), 三重保環研年報 第17号 (通巻第60号), 34-40(2015).
 - 15) 矢野拓弥, 前田千恵, 赤地重宏 他: 2015年9月上旬に上海への渡航歴のある患者から分離されたA (H1N1) pdm09ウイルスの遺伝子解析-三重県, 病原微生物検出情報, **36**, 223-224(2015).
 - 16) 矢野拓弥, 前田千恵, 楠原 一 他: 2016年9月上旬にシンガポールへの渡航歴のある患者から分離されたA/H3亜型インフルエンザウイルス-三重県, 病原微生物検出情報, **37**, 233-234(2016).
 - 17) 厚生労働省: 感染症発生動向調査事業実施要項の一部改正について (健発0212第4号 平成28年2月12日) .

Genetic correlation between AH3 subtype influenza viruses isolated during non-epidemic period and epidemic period in past 5 seasons in Mie prefecture (2012/13 season - 2016/17 season)

Takuya YANO and Shigehiro AKACHI

Keywords: AH3 subtype influenza virus, gene analysis, non-epidemic period

Hemagglutinin (HA) gene analysis was conducted for AH3 subtype influenza virus strains (AH3 subtype virus) isolated during past 5 seasons (2012/13 season - 2016/17 season) in Mie prefecture and genetic difference between those viruses obtained during non-epidemic period and epidemic period was investigated .

AH3 subtype viruses analyzed in non-epidemic period in each season were viruses closely related to AH3 subtype viruses which were mainly prevalent during epidemic period. From this observation, active investigation conducted through the epidemic and non-epidemic period suggest that disclose of gene characteristics of viruses make early grasp of viruses, which is responsible for the mainstream in epidemic period, possible.