

佐賀県におけるインフルエンザの流行 (2008/09シーズン)

微生物課 増本久人 平野敬之 南 亮仁 船津丸貞幸
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20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(2008/09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

2008年9月から2009年8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)123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)7事例35名のうがい液など、計158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(RT-PCR法等)

・鼻咽頭ぬぐい液からのインフルエンザRNA抽出法は、QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN, USA)を使用した。

・うがい液からのインフルエンザRNA抽出法は、10mlをCentricon Plus-20(MILLIPORE, USA)で濃縮し容量を1.0ml以下にした後、QIAamp UltraSens Virus Kit(QIAGEN, USA)を使用して行った。

・RT-PCR法によるインフルエンザウイルスの検出は、Herrmann, B. et al⁴⁾のHA領域をターゲットに設計されたprimerを用い、陽性検体についてはBigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing(Applied Biosystems, USA)でサイクルシーケンシングを実施後、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。

・新型インフルエンザAH1pdm型の遺伝子検出は、2009年5月以降から新型インフルエンザAH1pdmの流行により国立感染症研究所の病原体検出マニュアル⁵⁾に従ってリアルタイムPCR法およ

びコンベンショナル RT-PCR 法を実施した。(2009年5月より)

・抗インフルエンザ薬剤(オセルタミビル)耐性による遺伝子解析は、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、アミノ酸遺伝子配列におけるオセルタミビル耐性によるH275Yアミノ酸置換部位の有無について同定を行った。

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2008/09シーズンのインフルエンザ患者報告数は11,109名で、初発の患者は2008年9月下旬(第40週)に報告された。その後12月下旬(第52週)までの年内にかけ合計298名の患者報告があった。12月中旬の(第51週)には定点あたり1.0を超え、翌年の2009年1月上旬(第2週)頃から報告が再び急増し、1月中旬(第4週)に定点あたり40.54と大きなピークを迎えた。その後、2月上旬(第6週)頃から減少傾向を示し、7月下旬(第31週)に定点当たり0.0となった。しかし、2009年4月末にメキシコ、米国で新型インフルエンザAH1pdmが報告され、同年5月に国内初の感染者を確認後、流行は全国に拡大した。佐賀県内でも6月中旬(第26週)に初発患者を確認後、7月下旬(第31週)を除き、8月下旬(第35週)まで途切れることなく患者報告があった。

②集団事例(図1、表1)

佐賀県インフルエンザ施設別発生状況報告による2008/09シーズンの集団発生は、幼稚園5施設、小学校39施設、中学校20施設、患者総数1,062名であった。初発施設は鹿島市の小学校で、2008年11月11日(第46週)に報告され、患者数は12名であった。その後、2009年1月中旬(第4週)に患者数が増加し、1月下旬(第5週)には13施設199名をピークに3月中旬(第15週)まで連続発生が見られ、5月中旬(第21週)の1施設19名の発生を最後に2008/09シーズンの集団発生の報告は終息を迎えた。合計64施設患者総数1,062名の報告であった。

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

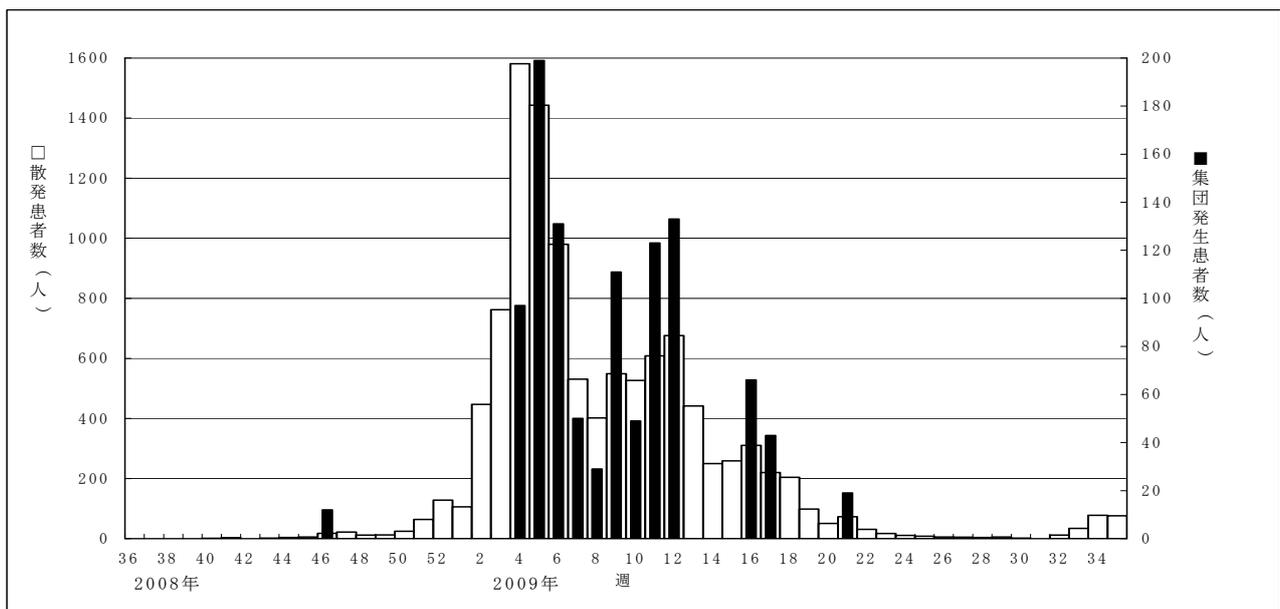


表 1 インフルエンザ集団発生施設別発生状況

施設	施設数	患者数	措置		
			休校	学年閉鎖	学級閉鎖
幼稚園	5	123	2	0	3
小学校	39	593	1	9	29
中学校	20	346	1	6	13
高等学校	0	0	0	0	0
短期・大学、他	0	0	0	0	0
計	64	1062	4	15	45

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 2)

検体は散発患者 123 名から採取され、例年のとおり検出している季節性インフルエンザの AH1 亜型 14 件、AH3 亜型 10 件、B 型 11 件と新たに新型インフルエンザ AH1pdm 型 53 件を検出・分離した。散発事例からの初検出は、昨シーズンより 1 週早く 2008 年 11 月 28 日 (第 48 週) の季節性 AH1 型であり、翌年の 2009 年 2 月 12 日 (第 7 週) まで検出された。その後、2009 年 7 月 2 日 (第 27 週) 1 件が検出された。AH3 型の初検出も昨シーズンより 3 週ほど早く 2008 年 12 月 19 日 (第 51 週) であり、翌年の 2009 年 3 月 2 日 (第 10 週) まで検出された。B 型は全てビクトリア系統株で、初検出は 2009 年 2 月 24 日 (第 13 週) であり、6 月 22 日 (第 26 週) まで検出された。新型インフルエンザ AH1pdm 型の初検出は 2009 年 6 月 26 日 (第 26 週) であり、第 30 週を除き、今シーズン最終週の 2009 年 8 月 28 日 (第 35 週) まで毎週検出された。

今シーズンは、例年のとおり季節性インフルエンザの AH1 亜型の流行で始まり、次いで AH3 亜型と B 型の検出順で流行し終息すると思われた。しかし、2009 年 5 月に国内初の新型インフルエンザウイルス AH1pdm 型による感染が確認された後、その流行は全国に広がり、2009 年 6 月 26 日 (第 26 週) 以降から今シーズン最終の第 35 週までに AH1pdm 型を 53 件検出した。このインフルエンザ検出の状況は過去に例はなく、2008/09 シーズンは 2 峰性のピークを示すインフルエンザウイルスによる流行シーズンを経験した。

また、インフルエンザウイルス陰性であった検体についてインフルエンザウイルス以外の呼吸器症状を示す病原体ウイルス検索を行った結果、2008 年 11 月 (第 48 週) ライノウイルス 88 型 1 件、2009 年 5 月 (第 21 週) ライノウイルス 43 型 1 件、2009 年 6 月 (第 26 週) ライノウイルス 29 型 1 件、2009 年 6 月 (第 27 週) ライノウイルス 85 型 1 件、2009 年 8 月 (第 35 週) ヒトメタニューモウイルス A2 型 1 件、合計 5 件を PCR 法で検出し遺伝子型解析および BLAST 検索などにより確認した。

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

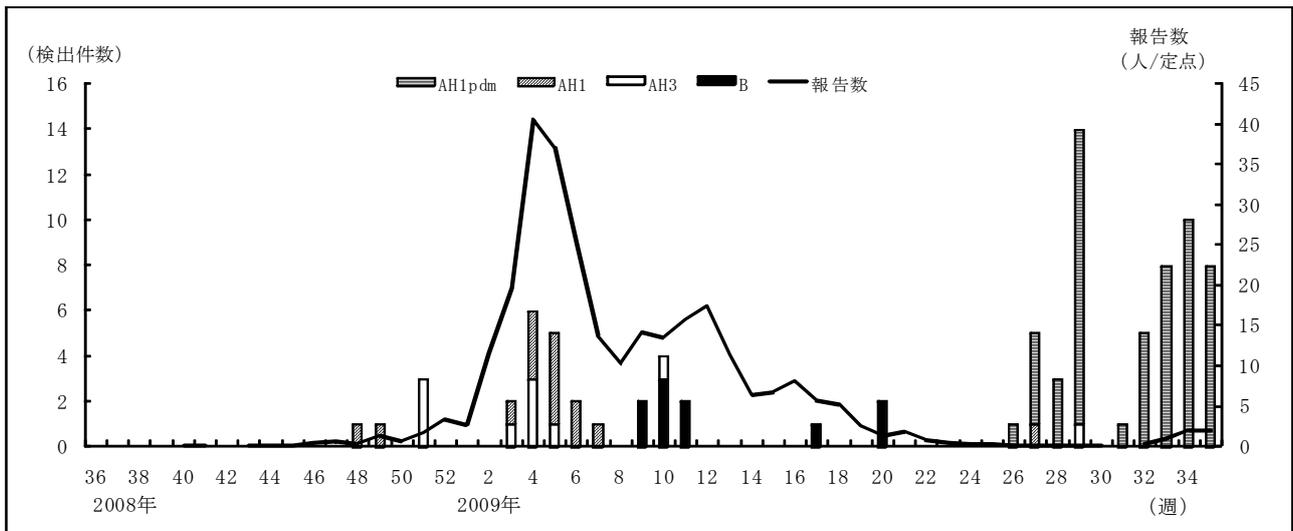


表2 分離株の同定結果

抗原(分離株名)	抗体	A/Brisbane/ 59/2007	A/Uruguay/ 716/2007	B/Brisbane/ 3/2007(Yama.)	B/Malaysia/ 2506/2004(Vic.)
A/Brisbane/59/2007		1280	<10	<10	<10
A/Uruguay/716/2007		<10	1280	<10	<10
B/Brisbane/3/2007		<10	<10	2560	40
B/Malaysia/2506/2004		<10	<10	10	2560
(AH1型)					
散発事例	A/SAGA/199/2008	160	<10	<10	<10
	A/SAGA/5/2009	40	<10	<10	<10
	A/SAGA/16/2009	320	<10	<10	<10
	A/SAGA/17/2009	640	<10	<10	<10
集団事例	A/SAGA/1004/2009	640	<10	<10	<10
	A/SAGA/1005/2009	320	<10	<10	<10
	A/SAGA/1011/2009	80	<10	<10	<10
	A/SAGA/1012/2009	80	<10	<10	<10
(AH3型)					
散発事例	A/SAGA/202/2008	<10	80	<10	<10
	A/SAGA/203/2008	<10	40	<10	<10
	A/SAGA/204/2008	<10	320	<10	<10
	A/SAGA/8/2009	<10	640	<10	<10
集団事例	A/SAGA/1046/2008	<10	160	<10	<10
	A/SAGA/1047/2008	<10	160	<10	<10
	A/SAGA/1048/2008	<10	80	<10	<10
	A/SAGA/1016/2009	<10	640	<10	<10
(B型)					
散発事例	B/SAGA/26/2009(Vic)	<10	<10	<10	160
	B/SAGA/28/2009(Vic)	<10	<10	<10	160
	B/SAGA/30/2009(Vic)	<10	<10	<10	160
	B/SAGA/31/2009(Vic)	<10	<10	<10	160
	B/SAGA/32/2009(Vic)	<10	<10	<10	160
	B/SAGA/34/2009(Vic)	<10	<10	<10	320
	B/SAGA/46/2009(Vic)	<10	<10	<10	80
	B/SAGA/49/2009(Vic)	<10	<10	<10	80
	B/SAGA/50/2009(Vic)	<10	<10	<10	160
集団事例	B/SAGA/1021/2009(Vic)	<10	<10	<10	160

今シーズン分離した代表株（散発事例と集団事例）を表2に示す。散発事例において分離されたAH1型4株については、全ての株がワクチン株のA/Brsbane/59/2007フェレット抗血清に対し、HI試験で2～32倍の力価差を認めた。AH3型は4株を分離し、ワクチン株のA/Uruguay/716/2007フェレット抗血清に対し、2～32倍の力価差を認めた。B型は9株を分離し、いずれもビクトリア系統株のB/Malaysia/2506/2004抗血清に対し、8～32倍の力価差であった。新型インフルエンザAH1pdm型の検出例については今シーズン分離およびHI価測定は遺伝子検出のPCR法による迅速対応を優先し実施していない。

②集団事例における検出状況（表3）

集団発生では7事例について検査を実施した。検体はうがい液35件（陽性数27件）で、検出率は77.1%であった。第4、5事例でAH1型が検出され、第2、3、6事例ではAH3型が検出され、B型については第1事例は山形系統株で第7事例はビクトリア系統株が検出された。

集団事例からはAH1型4株、AH3型4株、B型1株を分離した。AH1型については、ワクチン株のA/Brsbane/59/2007フェレット抗血清に対し、HI試験で2～16倍の力価差を認めた。AH3型については、ワクチン株のA/Uruguay/716/2007フェレット抗血清に対し、2～16倍の力価差を認めた。B型1株はビクトリア系統株でB/Malaysia/2506/2004抗血清に対し、16倍の力価差であった。

表3 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
H20.10.7（41）	杵藤	嬉野市、小学校	1	1	B型（山形系統）
H20.11.11（46）	杵藤	鹿島市、小学校	7	9	AH3亜型
H20.12.18（51）	伊万里	有田町、小学校	4	4	AH3亜型
H21.1.20（4）	唐津	唐津市、中学校	7	9	AH1亜型
H21.1.21（4）	佐賀中部	佐賀市、小学校	2	4	AH1亜型
H21.1.28（5）	鳥栖	鳥栖市、幼稚園	4	6	AH3亜型
H21.4.13（16）	伊万里	伊万里市、小学校	2	2	B型（ビクトリア系統）

3) 遺伝子解析結果（図3、4、5、6）

今シーズンの散発例・集団事例から検出・分離されたAH1亜型22件、AH3亜型25件、B型10件について、HA領域の遺伝子解析を行った。また、AH1亜型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）22件について遺伝子解析を実施した。なお、新型インフルエンザAH1pdm型53件の検出を見たが、リアルタイムPCR法による迅速検出を優先し遺伝子の塩基測定や遺伝子解析は実施していない。

AH1亜型は、ワクチン株であるA/Brsbane/59/2007の近隣に分枝を形成し、AH1亜型22株全てが296aaアミノ酸配列において98～99%の相同性を示した。アミノ酸置換についてワクチン株と比較した結果、全ての株はS141N、G185A、A189Tに共通した置換部位を認めた。

AH3 亜型は、ワクチン株である A/Uruguay/716/2007 とは若干、離れた系統樹の分枝を形成し、その中で 2008 年内に検出した事例 A グループと 2009 年内に検出した事例 B グループに別れた分枝状況であった。ワクチン株の A/Uruguay/716/2007 との相同性について、A、B 両グループは共に 98% の相同性で、両グループに属さない 2 事例については 96~97% の相同性を示した。アミノ酸置換についてワクチン株と比較した結果、S138A、G142R、K173Q、R194L が検出事例に共通したアミノ酸置換部位を認めた。

B 型は、全てビクトリア系統株で、ビクトリア系統のワクチン株(2006/07~2007/08 シーズン)である B/Malaysia/2506/2004 と近隣の分枝を形成し、ワクチン株との相同性は 98% を示していた。

AH1 亜型 抗インフルエンザ薬剤耐性株(オセルタミビル)の遺伝子解析については、今シーズン検出した AH1 型の NA 領域のオセルタミビル耐性置換部位(H275Y)について散発事例 13 件、集団事例の 2 事例 9 件の合計 22 株を検索した結果、すべての株が H275Y に置換を認め、オセルタミビル薬剤耐性株であることを確認した。

図 3 AH1 亜型 HA 領域系統樹解析

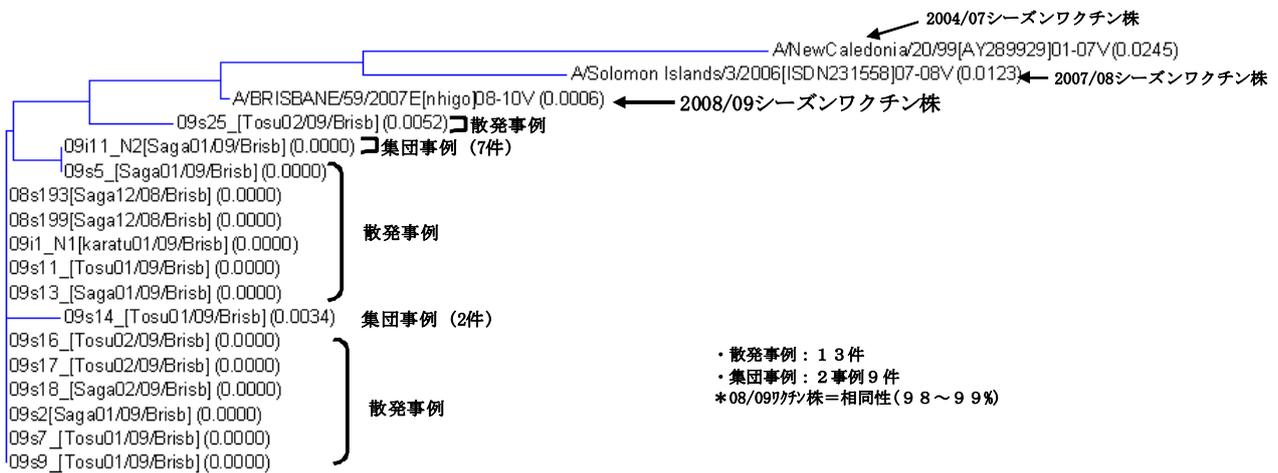


図 4 AH3 亜型 HA 領域系統樹解析

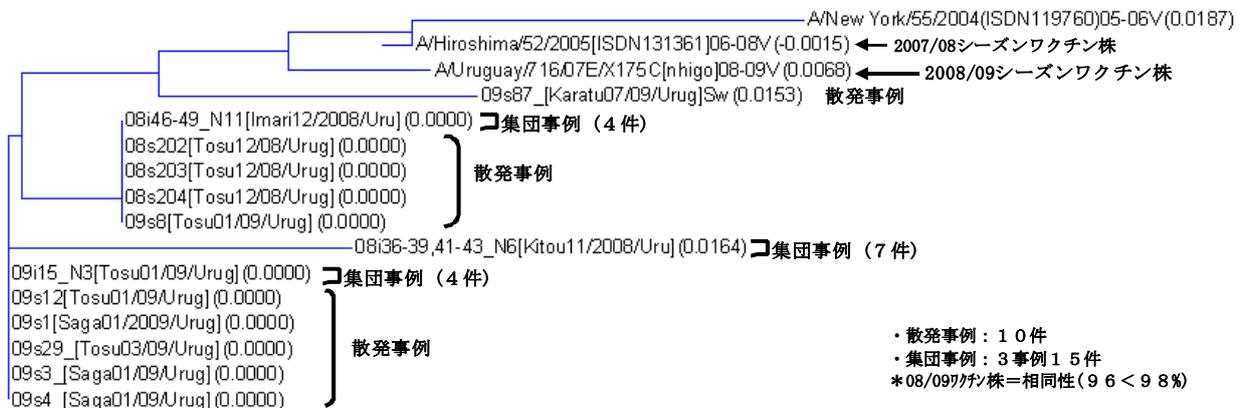


図5 B型HA領域系統樹解析

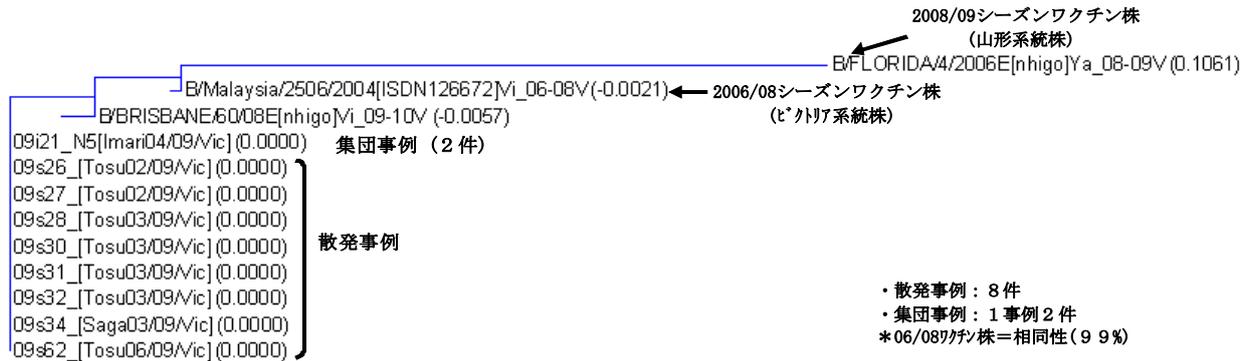
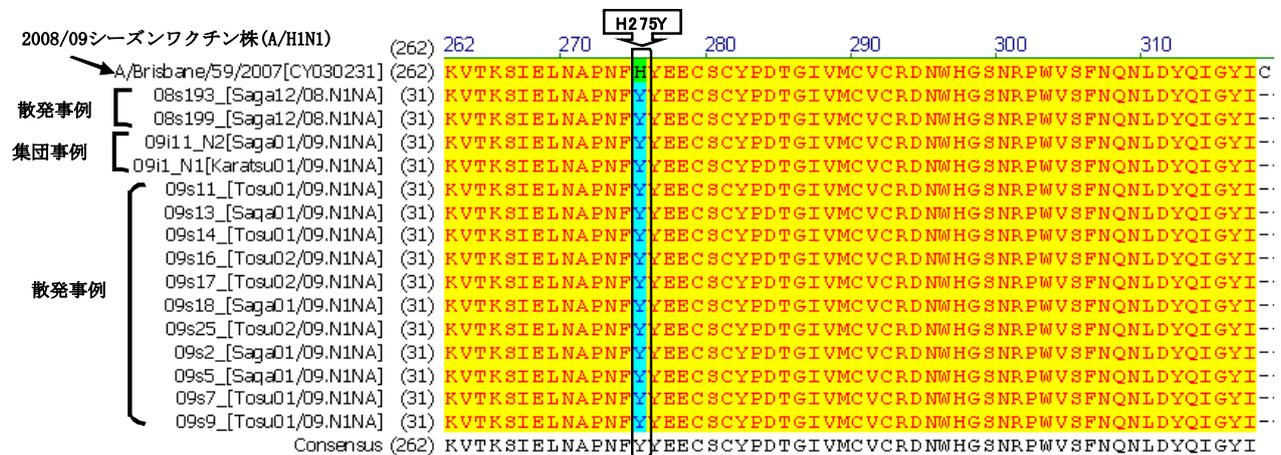


図6 AH1亜型抗インフルエンザ薬剤耐性株(オセルタミビル)NA領域(H275Y)遺伝子解析



4 考察

2008/09 シーズンにおける全国でのインフルエンザの流行は季節性のAH1亜型とAH3亜型が先行し、1月末にピークを形成した後、B型の流行で終息に向かっていった。しかし、5月以降、新型インフルエンザAH1pdm型の流行拡大により、異例な夏季インフルエンザ流行シーズン⁵⁾であった。佐賀県においても同様の状況で、季節性のAH1亜型、AH3亜型、B型の順に発生をみる混合流行で終息するかと思われた。しかし、全国の流行より1ヶ月ほど遅れて新型インフルエンザウイルスAH1pdm型による県内に流行が見られ、季節性および新型のインフルエンザウイルスによる特異な2峰性の流行パターンを示した2008/09シーズンであった。

AH1亜型は、昨シーズンのワクチン株であったA/Solomon Islands/3/2006に対する抗原変異を示す株が多くなったことから、A/Brisbane/59/2007へと変更になった。アミノ酸配列による遺伝子系統樹解析ではワクチン株とは昨シーズンのワクチン株より近縁で相同性は98~99%を示していた。HI試験では2~32倍の力価差を認めたが、8件中4件は4倍以内の力価差であり系統樹的には近縁を示している所見からワクチン効果については期待すると共に、今後の変異にも注視したい。

AH3亜型は昨シーズンのワクチン株のA/Hiroshima/52/2005に対して抗原変異を示すものが多く、2008/09シーズンはワクチン株がA/Uruguay/716/2007に変更になった。アミノ酸の遺伝子解析ではワクチン株のA/Uruguay/716/2007と近隣の分枝に属し、AグループとBグループに分枝形成を示していたが、検体との相同性は98%、両グループに属していない検体についても96~97%の相同性を示し、比

較的、ワクチン株に近縁であった。HI 試験で2~32倍の力価差を認めることから、今後の変異には注意が必要であると思われる。

B型は昨シーズンのワクチン株はビクトリア系統株であったが、流行の多くが山形系統株であったことから、山形系統株のワクチン株に変更になった。アミノ酸による遺伝子解析の結果、昨シーズンのワクチン株であるビクトリア系統株であるB/Malaysia/2506/2004と近隣の分枝を形成し、全ての検体が98%の相同性を示しビクトリア系統株に属していた。HI試験ではビクトリア系統株で昨シーズンのワクチン株であるB/Malaysia/2506/2004抗血清に対しては、8~32倍の力価差を見ることから、今後の分離株の変異状況などに注視する必要があると思われる。

AH1型抗インフルエンザ薬剤耐性株(オセルタミビル)については、2007/08シーズンよりEU諸国でオセルタミビル耐性株の拡大が懸念されている事態を受け、国内でも2008/09シーズンに入り調査が行われた。当所もAH1亜型検出例の22件について、AH1亜型のNA領域におけるオセルタミビル耐性部位であるH275Yのアミノ酸置換の有無を検索した結果、すべてH275Yの耐性株であることが判明した。しかし、今シーズンのワクチン株であるA/Brisbane/59/2007と抗原性は類似していることから、今シーズンのワクチンは有効⁷⁾であることが示唆された。

新型インフルエンザウイルスAH1pdm型については、2009年3月中旬に発生したブタ由来のA/H1N1新型インフルエンザAH1pdm型は流行拡大し4月中旬に米国へ波及し、6月にWHOからパンデミック警戒レベルの「フェーズ6」が出された。国内では5月に初発例を確認後、全国各地でも新型インフルエンザウイルスAH1pdm型が流行拡大し、地方衛生研究所でも次々に検出され、この検出状況は毎日、マスコミ報道された。佐賀県でも2009年6月26日(第26週)に海外帰国者による第1例目を確認した以降、今シーズン最終の第35週までにAH1pdm型53例を確認し、異例な2008/09インフルエンザウイルスの流行シーズンであった。

以上より、今後もインフルエンザウイルス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られる。

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