

インフルエンザウイルス検出状況（2019/2020 シーズン）

鈴木典子 篠原美千代 江原勇登 小川泰卓 大崎哲 青沼えり 宮下広大 内田和江

Detection of influenza virus
(2019/2020 season)

Noriko Suzuki, Michiyo Shinohara, Hayato Ehara, Yasutaka Ogawa,
Satoshi Daisaki, Eri Aonuma, Kodai Miyashita, Kazue Uchida

はじめに

当所では、埼玉県感染症発生動向調査事業¹⁾の一環として、インフルエンザウイルス(IFV)の型別を実施している。また、厚生労働省からの依頼で、「抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス」実施要綱²⁾に基づきノイラミニダーゼ阻害薬耐性株サーベイランス及びパロキサビル耐性株サーベイランスを実施している。今回は、2019年9月から2020年3月まで(2019/2020シーズン)のIFVの流行状況に薬剤耐性調査及び系統樹解析の結果を合わせて報告する。

対象及び方法

1 インフルエンザ患者発生動向調査

埼玉県感染症発生動向調査事業として埼玉県感染症情報センターのホームページに公開³⁾された埼玉県におけるインフルエンザ患者の定点当たり報告数を使用し、集計した。

2 インフルエンザ検体からのIFV検出と型別

2019/2020シーズンに、県域(埼玉県からさいたま市を除いた地域)において感染症発生動向調査としてインフルエンザと診断された患者から採取された536検体(鼻汁289検体、鼻腔ぬぐい液174検体、咽頭ぬぐい液73検体)を調査対象とした。

各検体からRNAを抽出し、A(H1N1)pdm09(AH1pdm)、A香港型(AH3)、B型についてインフルエンザ診断マニュアル⁴⁾に準じて、リアルタイムRT-PCR法で遺伝子を検出した。

3 薬剤耐性調査

2019/2020シーズンに感染症発生動向調査として採取された検体をMDCK細胞に接種し、分離されたIFV株のうち採取時期及び地域が偏らないように選定した108株(AH1pdm94株、AH35株、B型ビクトリア系統(Bvic)9株)を調査の対象とした。

分離されたIFV株から抽出したRNAを使用し、インフルエンザ診断マニュアル⁴⁾に準じてノイラミニダーゼ(NA)遺伝子及びPA遺伝子を増幅後、同マニュアル及び既報^{5,6)}のプライマーを用いダイレクトシーケンス法により塩基配

列を決定した。得られた塩基配列から、GENETYX Ver. 14(ゼネティックス)を用いてアミノ酸配列を決定後、NA阻害薬及びエンドヌクレアーゼ阻害薬に対して耐性に関与する可能性があるとして報告^{2),7)}のあった変異部位について、変異の有無を調査した。

ただし、AH1pdm94株のうち72株については、インフルエンザ診断マニュアル⁴⁾に準じて、リアルタイムRT-PCR(TaqMan Probe)法を実施し、NA阻害薬に対するH275Y耐性変異の有無のみを調査した。

なお、変異はH275Yのように表され、275番目のアミノ酸はH(ヒスチジン)がY(チロシン)に変わっていることを示している。

4 系統樹解析

2019/2020シーズンに感染症発生動向調査として採取された検体をMDCK細胞に接種し、分離されたIFV株のうち、各亜型・系統別に各月約3株を採取地域が偏らないように選定し、31株(AH1pdm17株、AH35株、Bvic9株)を解析の対象とした(表1)。

表1 亜型・系統別系統樹解析株数

	AH1pdm	AH3	Bvic
9月	3	0	1
10月	3	0	0
11月	3	2	0
12月	3	1	3
1月	2	0	2
2月	2	1	2
3月	1	1	1
合計	17	5	9

分離されたIFV株から抽出したRNAを使用し、インフルエンザ診断マニュアル⁴⁾に準じてHAタンパク質をコードする領域(HA遺伝子)を増幅後、同マニュアルのプライマーを用いダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

得られた塩基配列はGISAIID(Global Initiative on Sharing All Influenza Data)⁸⁾に登録されている日本全国及び世界各国で解析された株から各サブクレードに属する株を適宜選び、それらの株とともに、近隣結合法による系統樹解析を実施した。

結果及び考察

1 インフルエンザ患者発生動向調査

図1に埼玉県における定点当たり患者報告数及び県域における IFV 検出状況を示した。

埼玉県の2019/2020シーズンの定点当たり患者報告数は2019年第46週に1.00を超えて流行期に入り、2019年第51週に29.57に達してピークとなった。第52週以降は報告数が減少し、2020年第12週には0.42となり非流行期となった。2019/2020シーズンは、過去のシーズンと比較すると例年明けにみられるピークがなく、ピーク値の29.57は AH1pdm の出現した2009年以降、最低値であった。

2 IFV 検出と型別

IFV の亜型・系統別検出状況は、表2に示すとおりで、AH1pdm が432件(84.2%)と最も多く、次いでBvic が70件、AH3が10件で、B 型山形系統 (Byam) は検出されなかった。2018/2019シーズンは、AH3が流行の主流であったが⁹⁾、今シーズンはAH1pdm が主流であり、AH3の検出は少なかった。また、2017/2018シーズン以前は、B 型は年明け以降に流行する傾向がみられており⁹⁾、今シーズンも B 型は年明け以降から流行の終わりにかけて多く検出される傾向がみられた (図1)。2019/2020シーズン全体を通してAH1pdm が多く検出されたのは、全国と同様の傾向であった⁹⁾。

検体の種類別の IFV 検出数は、表3に示すとおりで、鼻腔由来検体 (鼻汁及び鼻腔ぬぐい液) と咽頭ぬぐい液を比較すると、ウイルス不検出数は鼻腔由来検体463検体のうち13検体 (3%)、咽頭ぬぐい液73検体のうち10検体 (14%) であった。また、A 型の亜型が決定できなかった1検体は咽頭ぬぐい液であった。さらに、リアルタイム RT-PCR 法における検出 Ct 値の平均値を比較すると、A 型共通 M 遺伝子では、鼻腔由来検体25 (標準偏差4.0) に対し、咽頭ぬぐい液は28 (標準偏差4.8) であった。また、B 型共通 NS 遺伝子では、鼻腔由来検体25 (標準偏差3.1) に対し、咽頭ぬぐい液は28 (標準偏差3.9) であった。以上の結果から鼻腔由来検体の方が咽頭ぬぐい液に比べ検出され易い傾向がみられた。この傾向は2018/2019シーズンと同様であった¹⁰⁾。

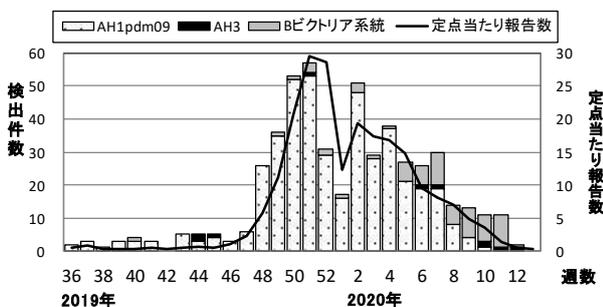


図1 埼玉県における定点当たり患者報告数及び県域におけるIFV検出状況

表2 亜型・系統別IFV検出数と検出割合

	検出数	検出割合
AH1pdm	432	84.2%
AH3	10	2.0%
Bvic	70	13.6%
Byam	0	0.0%
A	1	0.2%

表3 検体の種類別検体数とIFV検出数

	検体数	不検出	A	AH1pdm	AH3	B
鼻腔由来検体	463	13	0	385	10	55
咽頭ぬぐい液	73	10	1	47	0	15
合計	536	23	1	432	10	70

3 薬剤耐性調査

(1) 表4にNA阻害薬耐性変異検査結果を IFV の型・亜型別に示した。

1) AH1pdm

94株を解析し、H275Y 耐性変異は検出されなかった。また、22株について H275Y 以外の14か所の変異部位を調査した結果、1株でS247N 変異が認められた。国立感染症研究所で薬剤感受性試験を実施した結果、オセルタミビル、ペラミビル、ザナミビル、ラニナミビルの全ての薬剤に対して、わずかながら感受性が低下していることが確認された。S247N 変異は、単独では感受性の低下はわずかであるが H275Y 耐性変異との組み合わせにより相乗効果で高度耐性を示すことが報告されている⁷⁾。全国では、2427株が解析され、38株 (1.6%) から H275Y 変異が検出された⁹⁾。

2) AH3

5株について薬剤耐性に関与する可能性がある10か所の部位の変異の有無を調査し、変異は認められなかった。全国では、65株が解析され、耐性株は検出されなかった⁹⁾。

3) B 型

9株について薬剤耐性に関与する可能性がある30か所の部位の変異の有無を調査し、変異は認められなかった。全国では、97株が解析され、耐性株は検出されなかった⁹⁾。

表4 NA阻害薬耐性変異検査結果

	検査数	耐性変異株数
AH1pdm	94	0
AH3	5	0
Bvic	9	0

(2) 表5にエンドヌクレアーゼ阻害薬耐性変異検査結果を、型・亜型別に示した。

1) AH1pdm

17株を解析し、変異は認められなかった。全国では、790株が解析され、1株 (0.13%) から耐性株が検出された⁹⁾。

2) AH3

5株を解析し、変異は認められなかった。全国では、63株が解析され、耐性株は検出されなかった⁹⁾。

3) B型

9株を解析し、変異は認められなかった。全国では、86株が解析され、耐性株は検出されなかった⁹⁾。

表5 エンドヌクレアーゼ阻害薬耐性変異検査結果

	検査数	耐性変異株数
AH1pdm	17	0
AH3	5	0
Bvic	9	0

4 系統樹解析

HA 遺伝子の系統樹解析の結果を図2 (AH1pdm), 図3 (AH3) 及び図4 (Bvic) に示した。

(1) AH1pdm

解析に用いた17株はすべて2019/2020シーズンのワクチン株 A/Brisbane/02/18と同じクレード6B. 1に属した。6B. 1内には、S183Pを含む7個の群(183P-1~183P-7)が存在し、183P-5内には、183P-5Aと183P-5Bが集団を形成している⁹⁾。17株は全て183P-5Aであった。また、1月に検出された1株と2月及び3月に検出された株は抗原性の変異に係るN156Kを持つ集団に属した(図1中①)。全国での検出割合も183P-5Aが99%と最も多く、N156K変異を持つ株は3%であったが、1月以降に検出された株が多い点は、県域と同様の傾向であり⁹⁾、次シーズンはこれらの動向に注意が必要であると思われる。

(2) AH3

最近の流行株はクレード3C. 2aと3C. 3aに分類されている⁹⁾。解析した5株は全て3C. 2aに属し、2019/2020シーズンのワクチン株A/Kansas/14/17の属する3C. 3aに属する株は検出されなかった。全国でも3C. 3a株は検出されておらず、県域における検出状況は、全国と同様の傾向であった⁹⁾。

(3) Bvic

クレード1A内には、サブクレード1A. 1, 1A. 2, 1A. 3が存在している⁹⁾。解析した9株は全て1A. 3に属し、2019/2020シーズンのワクチン株 B/Maryland/15/16の属する1A. 1に属する株は検出されなかった。全国でも解析株は全て1A. 3に属しており、県域と同様の傾向であった⁹⁾。

今回の調査では、薬剤耐性株は検出されなかったが、わずかに感受性の低下のみられる株が検出された。また、系統樹解析からは、抗原性の異なる集団のウイルスが検出された。今後も薬剤耐性株や抗原性変異株が検出される可能性はあることから、継続的な調査を実施していくことが必要であると考えられる。

文献

- 1) 埼玉県：埼玉県感染症発生動向調査事業実施要綱，<http://www.pref.saitama.lg.jp/a0701/kansen/kansensyohasseitodoke.html> (2020年7月19日現在)
- 2) 国立感染症研究所：2018/2019シーズン抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス実施要綱令和元年9月12日
- 3) 埼玉県感染症情報センター発生動向調査 <http://www.pref.saitama.lg.jp/b0714/surveillance/index.html> (2020年7月19日現在)
- 4) 国立感染症研究所及び地方衛生研究所全国協議会病原体検出マニュアル インフルエンザ診断マニュアル(第4版) 平成30年12月 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20190116.pdf> (2020年9月10日現在)
- 5) K. E. wright, G. A. R. Wilson, D. Novosad et al. : Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. J. Clin. Microbiol. 33(5), 1180-1184, 1995
- 6) X. Sherry Chi, Aizhong Hu, Trentice V. Bolar et al. : Detection and characterization of new influenza B virus variants in 2002. J. Clin. Microbiol. 43(5), 2345-2349, 2005
- 7) World Health Organization: Summary of neuraminidase amino acid substitutions associated with reduced inhibition by neuraminidase inhibitors (NAI), http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/nai_overview/en/ (2020年9月10日現在)
- 8) GISAIID, <http://platform.gisaid.org/> (2020年7月19日現在)
- 9) 国立感染症研究所：インフルエンザウイルス分離検出速報。病原微生物検出情報，<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-inf.html> (2020年7月19日現在)
- 10) 鈴木典子，内田和江，篠原美千代，他：インフルエンザウイルス検出状況(2018/2019シーズン)。埼玉県衛生研究所報，53, 87-91, 2019

□ ワクチン株

● 埼玉株 (解析株, 株名の最後に採取月を記載)

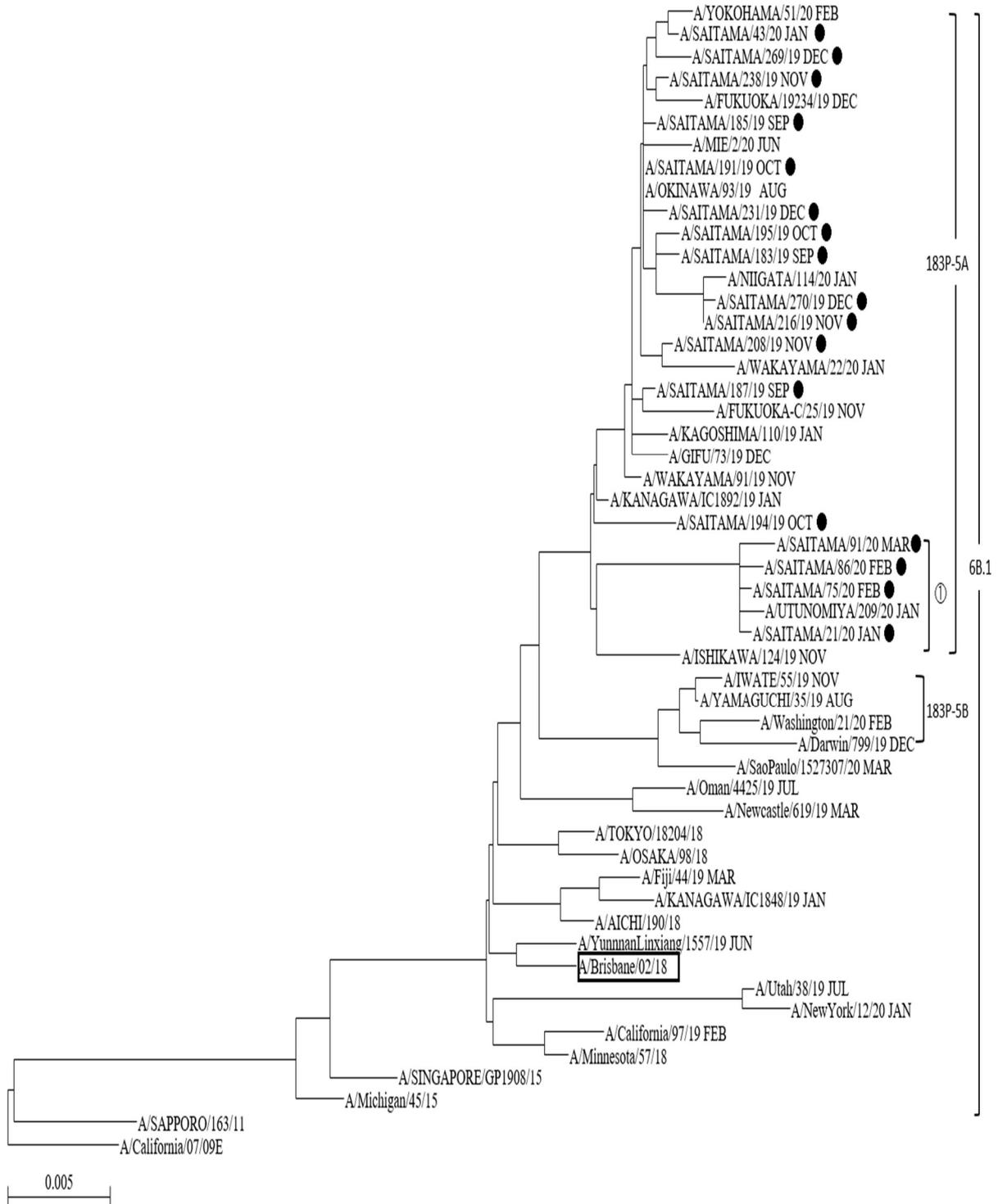


図2 HA遺伝子系統樹解析(AH1pdm)

□ ワクチン株

● 埼玉株 (解析株, 株名の最後に採取月を記載)

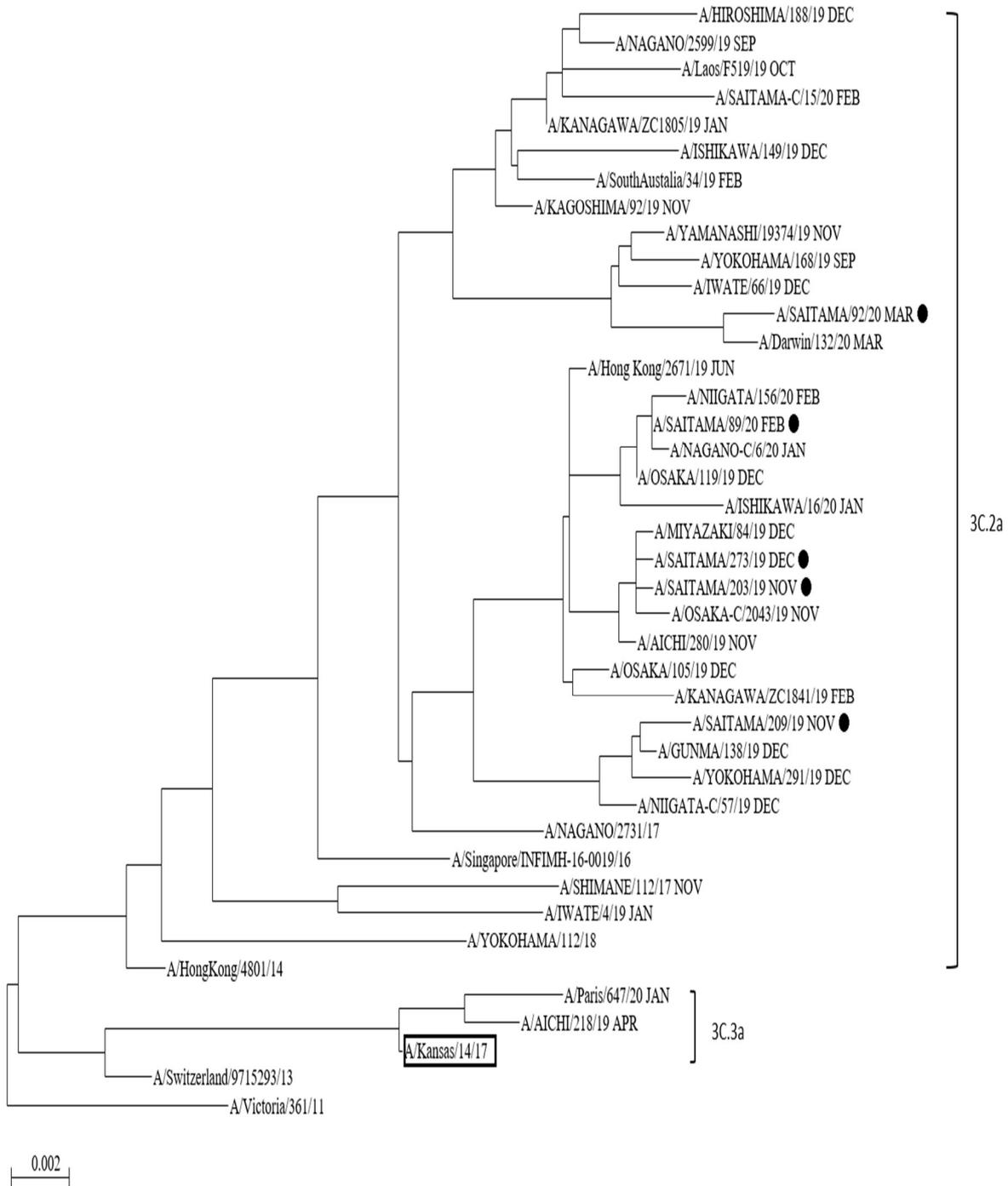


図3 HA遺伝子系統樹解析(AH3)

