

## 香川県域に浸淫した新型 Influenzavirus AH1pdm の疫学解析について

## Epidemiological Analysis of Influenzavirus AH1pdm in Kagawa Prefecture

多田 芽生      薦田 博也      池本 龍一      三木 一男\*  
Megumi TADA   Hiroya KOMODA   Ryuichi IKEMOTO   Kazuo MIKI

## 要 旨

香川県域における新型インフルエンザの動向は、初発から 2009/2010 シーズンまでは、罹患年齢群の変遷する季節性インフルエンザに類似する感染拡大の様相が確認された。また、HI 価の多様性より複数の侵入経路を推測させるとともに、特定地域での限局流行を推察させるなど、新型インフルエンザウイルスの浸淫の足跡が確認された。系統樹解析により、初発から 2009/2010 シーズンの分離株は、2010/2011 シーズンワクチン株と単一のクラスターに属していて、遺伝的にも均一であることが示された。

2010/2011 シーズンでは、罹患年齢群に変化がみられた。系統樹解析の結果、2010/2011 シーズン流行株は、ワクチン株の類似株と、抗原性の変異により遺伝子的に同一系統ではあるが相同性が低下した株が入り混じった流行であると考えられた。

今回の新型インフルエンザに対し、当センターは危機管理能力を向上させつつ、検査体制を確立してきた。新型インフルエンザウイルスと H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは交雑しやすいとの報告もあるため、新たな H5N1 の出現に備え、現在の検査体制の維持強化していくことが必要であると思われる。

キーワード：新型インフルエンザ，AH1pdm，浸淫状況，香川県

## I はじめに

2009 年 4 月中旬にメキシコで発生した新型 Influenza virus AH1pdm (以下、新型インフルエンザ) は、瞬く間に全世界に伝播し、4 月 28 日の WHO による新型インフルエンザ宣言に続き、日本では「感染症の予防及び感染症の患者に対する法律」の第 6 条第 7 項に規定される新型インフルエンザ等感染症へと指定され、疑い事例を含め、全数検査を実施することになった。香川県において新型インフルエンザは 2009 年 6 月 21 日に輸入例として初発検出され、7 月 10 日までの 10 例は全て輸入例であったが、7 月 12 日以降より集団発生事例が散見され始め、県下全域に波及していった。当センターは、流行初期の患者確定のための検査、その後の入院・重症患者の検査、集団発生時のクラスターサーベイランス、定点医療機関からのウイルスサーベイランス検査を実施してきた。今回、初発からの新型インフルエンザの県下への浸淫の様相を疫学解析し、新たな知見が得られたので報告する。

## II 方法

2009 年 4 月～2011 年 2 月までに当センターへ搬入された咽頭拭い液 476 検体、髄液 5 検体について、国立感染症研究所より提示された診断検査マニュアル<sup>1),2)</sup>に従い、HA 領域、A 型共通 M 蛋白領域のリアルタイム RT-PCR 検査を実施した。

初発から 2009/2010 シーズンに新型インフルエンザ陽性と判定された 292 検体について、MDCK 細胞を用いて分離培養し、常法に従って HI 価を測定した。得られた HI 価を基に、疫学上重要と推測される 55 検体を選定し、診断検査マニュアルに従い、PCR 法で増幅された HA 領域 349bp についてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定後、近隣結合法を用いて系統樹を作成した。

2010/2011 シーズンについても、同様に系統樹を作成し、初発から 2009/2010 シーズン分離株およびワクチン株と 2010/2011 シーズン分離株との比較を行った。

H1N1pdm オセルタミビル耐性株については、HI N1pdm オセルタミビル耐性株検出法実験プロトコール<sup>3)</sup>に従い、SNP 解析により、新型インフルエンザウイルス NA 遺伝子

\* (財) 香川県食鳥衛生検査センター

についてオセルタミビル耐性マーカー(H275Y)の検出をおこなった。毎週3株を無作為抽出した26検体および耐性菌検査依頼の3株について実施した。H275Y耐性マーカーが同定された場合は、分与依頼に基づき国立感染症研究所に検体を送付し、NA-Star基質を用いた化学発光法によって抗インフルエンザ薬剤感受性試験を実施した。なお、この試験は感染研インフルエンザウイルス研究センター第一室において実施された。

### Ⅲ 結果

図1にインフルエンザAH1pdm, H3N2の検出数を示す。全数検査及びクラスターサーベイランスにより、2009年7月、8月に新型インフルエンザ検出数が増加した。A香港型については、2008/2009シーズン冬季からの継続流行により新型インフルエンザ検査開始後も検出され、輸入例を除き7月には終息する流行像を示した。2008/2009シーズンに流行したAソ連型については検出されなかった。2010年4月以降は新型インフルエンザ、A香港型ともに散発事例のみで、大きな流行はなく、2010年12月までは新型インフルエンザよりA香港型が多く検出された。2011年1月に、新型インフルエンザが急激に

増加し、A香港型の検出数も増加した。第7週まではA香港型より新型インフルエンザが多く検出されていたが、第8週は新型インフルエンザよりA香港型が多く検出された。2011年3月以降はA香港型しか検出されていない。2009/2010シーズンに引き続いて2010/2011シーズンにおいても、Aソ連型は検出されなかった。

図2は、香川県内の定点医療機関から報告されたインフルエンザ患者数から作成した月別年齢別発生状況である。若年層のうち、0から4歳の年齢層については、初発から2009/2010シーズンにおいては、11月から12月のピークであったが、他の若年層は11月をピークとする流行像を示した。成人層の流行は12月にピークとなっており、若年層から一ヶ月ほどの遅れが確認され、季節性インフルエンザに類似する感染拡大の様相が伺えた。

2010/2011シーズンでは、12月から患者が出始め、1月に入ると急激に増加し、2月にはさらに増加した。初発から2009/2010シーズンで若年層での流行が大きかったため、2010/2011シーズンはすべての年齢群で同様な流行像を示した。成人層においては、2月以降30歳代の患者が最も多くなり、罹患年齢群に変化がみられた。

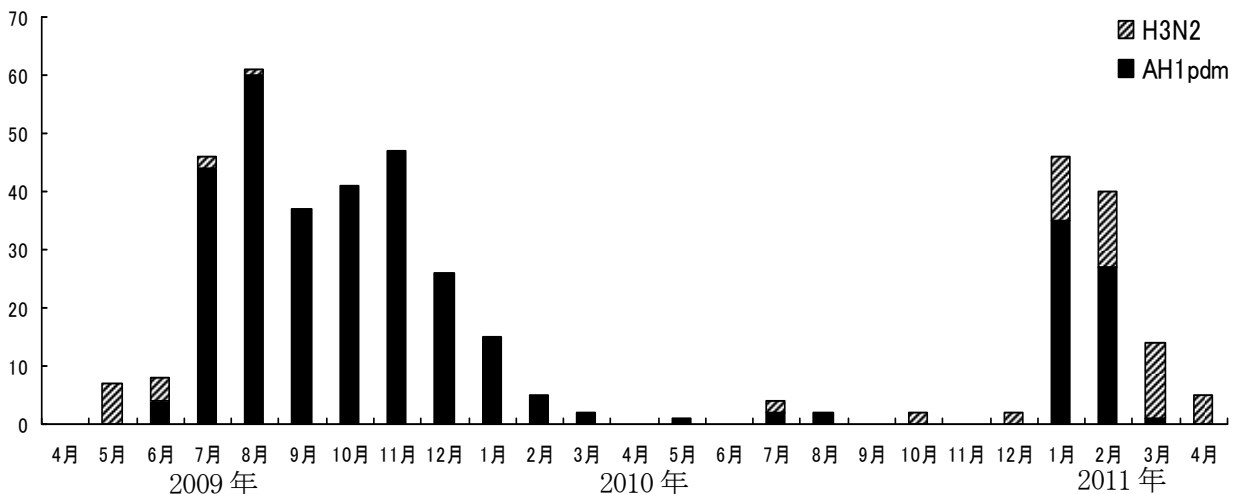


図1 AH1pdm, H3N2 分離・検出状況

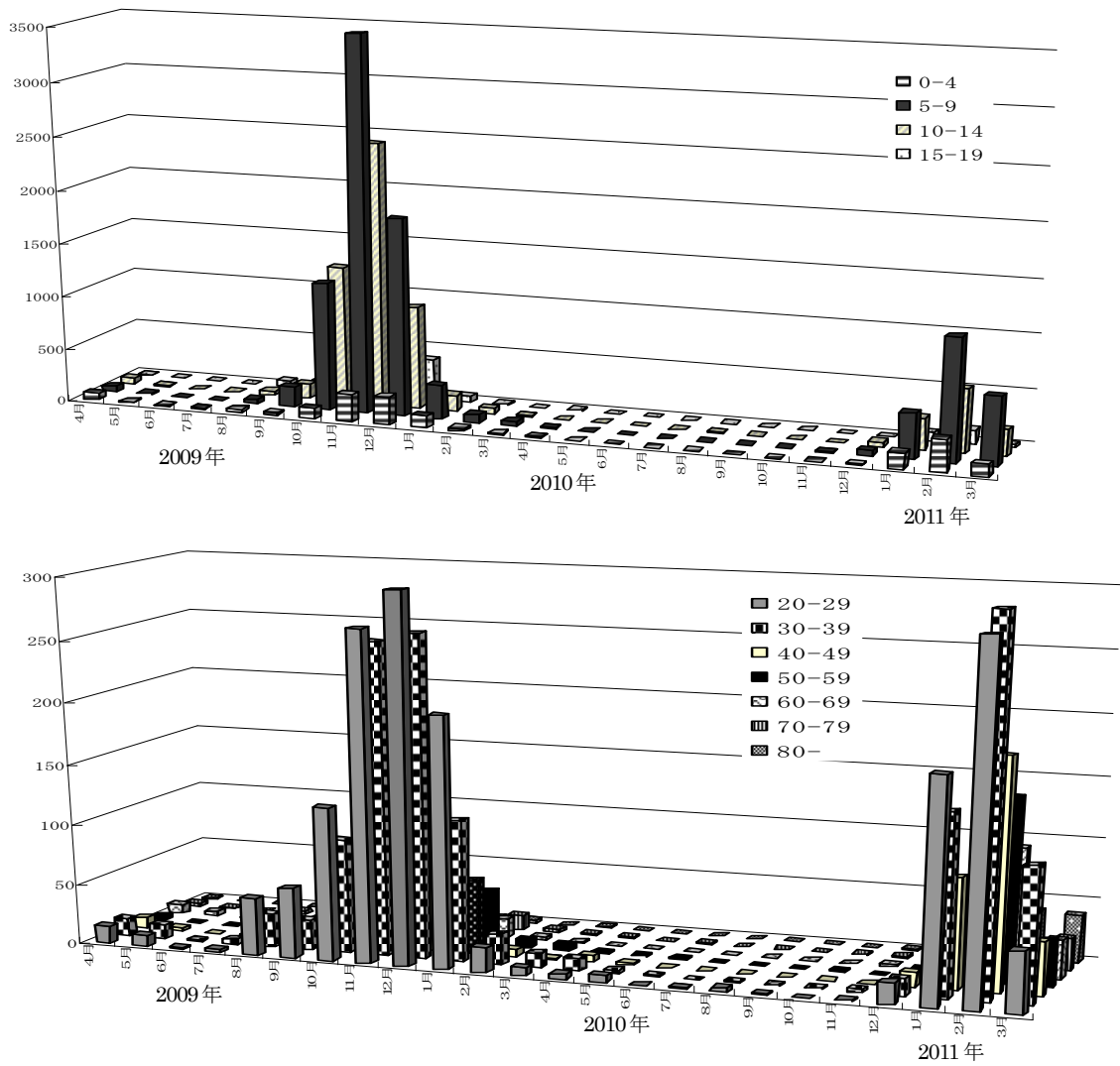


図2 年齢別発生状況

表1に、初発から2009/2010シーズンまでに分離された新型インフルエンザのHI 価を示す。細胞培養法により、新型インフルエンザが153株分離され、分離株の内訳は輸入株10株 6.6%、市中流行株143株 93.4%であった。輸入株はHI 価1:320から1:1280に対し、市中流行株は1:80から1:5120と多様な抗原力価を示す株が確認された。

図3は、初発から2009/2010シーズンまでの県内5保健所管轄毎の新型インフルエンザのHI 価の分布である。1:80から1:5120までのHI 価で1:320をピークとする分布状況であった。高松、西讃地区で多様な抗原力価が確認されたのに対し、東讃、小豆地区では1:320から1:640と、地区によりHI 価の分布に相違が認められた。

2009年7月、8月に西讃・高松地区において多様な抗原力価を示す株が確認され、浸淫当初に複数の感染経路を予測させた(表2)。また、西讃地区では、大き

く抗原性が相違した1:80の株が8月、9月に限局流行したことが確認された。

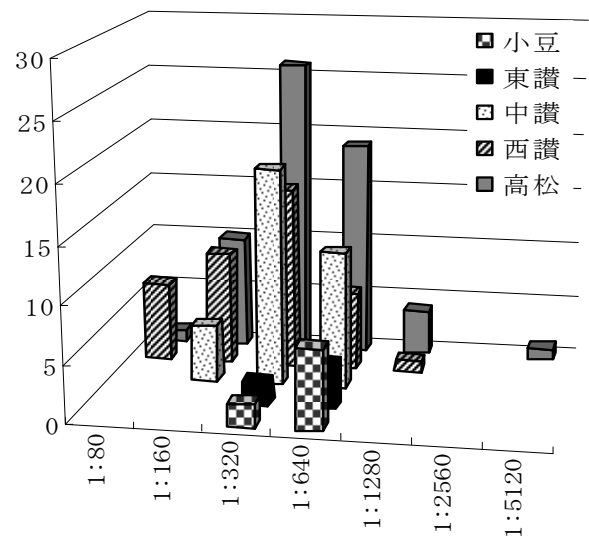


図3 地区別AH1pdm HI 価の分布 (初発から2009/2010シーズン)

表1 AH1pdmのHI 価 (初発から2009/2010 シーズン)

	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	計
輸入株			3 (2.0%)	6 (3.9%)	1 (0.7%)			10 (6.6%)
市中流行株	8 (5.2%)	25 (16.3%)	62 (42.5%)	43 (32.0%)	4 (3.3%)		1 (0.7%)	143 (93.4%)
計	8 (5.2%)	25 (16.3%)	65 (42.5%)	49 (32.0%)	5 (3.3%)	0 (0.0%)	1 (0.7%)	153 (100.0%)

表2 西讃・高松地域における月別HI 抗体価 (初発から2009/2010 シーズン)

西 讃	2009.6	2009.7	2009.8	2009.9	2009.10	2009.11	2009.12	2009.1	2009.2	2009.3
1:80			1	6						
1:160			6	3	1					
1:320	1(1)		6	5	3	1				
1:640			6				1			
1:1280		1								
1:5120										

高 松	2009.6	2009.7	2009.8	2009.9	2009.10	2009.11	2009.12	2009.1	2009.2	2009.3
1:80						1				
1:160		2		2	3	3				
1:320		4(2)	1	4	5	8	1	1	2	
1:640	2(2)	9(2)	4				1	3		
1:1280	1(1)		1			1		1		
1:2560										
1:5120							1			

HA 遺伝子の一部分の塩基配列を決定し、ワクチン株を用いて系統樹を作成した(図4)。系統樹解析の結果、初発から2009/2010 シーズンに分離された40株は国内で初期に分離された A/NARITA/1/2009pdm と同一の塩基配列であった。解析した55全株は2010/2011 シーズンワクチン株である A/California/07/2009pdm と単一のクラスターに属していて、ウイルス株と類似しており、遺伝的にも均一であることが示されたが、ワクチン株から1~4塩基の差異が認められた。

図5に、2010/2011 シーズン分離株のHA 領域の系統樹を示す。2010/2011 シーズン分離株は、初発から2009/2010 シーズン分離株、ワクチン株 A/California/07/2009pdm を含む大きな枝に含まれ、単一のクラスターに属していた。一方、抗原性が変異し、2010/2011 シーズン分離株のみで初発から2009/2010

シーズン分離株、ワクチン株とはやや離れた位置に別のクラスターを形成しており、2010/2011 シーズン分離株はワクチン株とは遺伝的に同一系統ではあるが、相同性が低下した株の流行もみられた。

2010/2011 シーズンに実施したH1N1pdm オセルタミビル耐性株については、無作為抽出した検体からは耐性マーカーは検出されず、タミフルを治療投与されたが症状が改善せず、臨床的に耐性が疑われる3検体のうち2件から耐性マーカーが検出された。耐性マーカーが検出された検体を感染研に送付し、インフルエンザウイルス研究センター第一室で実施した薬剤感受性試験の結果を表3に示す。耐性疑いとして検査依頼された2件とも、オセルタミビルおよびペラミビルに対して耐性であった。しかし、ザナミビルおよびラニナミビルに対しては感受性であった。

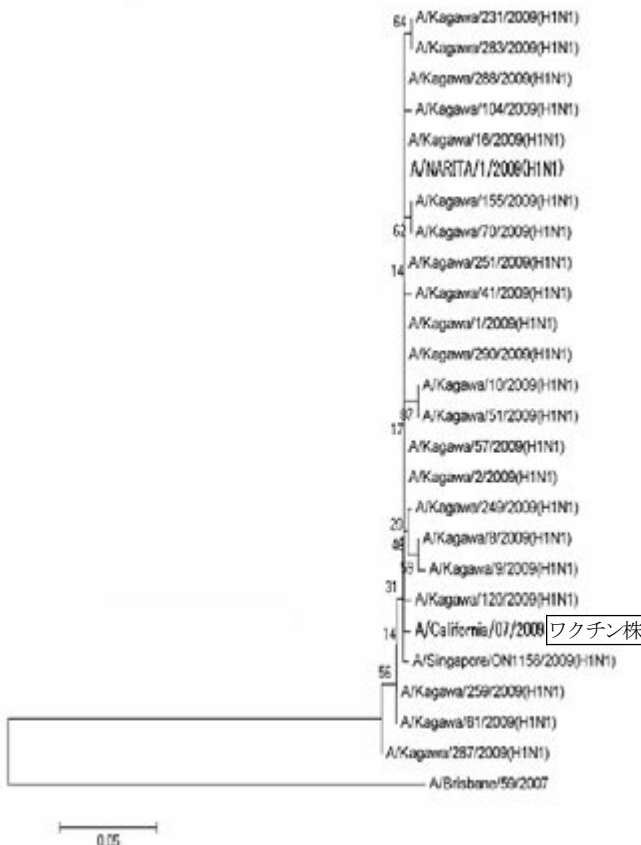


図4 HA 遺伝子 (349bp) に基づく分子系統樹 (初発から 2009/2010 シーズン)

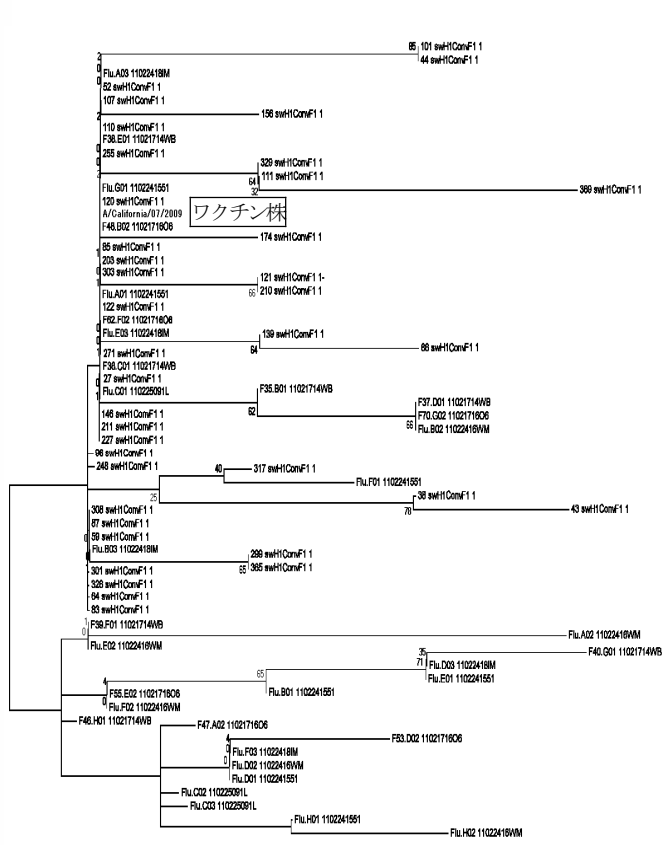


図5 HA 遺伝子 (349bp) に基づく分子系統樹 (2010/2011 シーズン)

表3 2010/2011 シーズン抗インフルエンザ薬剤感受性試験

ウイルス株名	亜型名	検体採取 年月日	耐性 マーカー	薬剤投与状況	IC50 (nM)*			
					オセルタミビル	ペラミビル	ザナミビル	ラニナミビル
A/KAGAWA/1/2011	AH1pdm	2011/01/31	275Y	タミフル治療投与 2011/01/26 から	106.73	10.09	0.50	0.88
A/KAGAWA/2/2011	AH1pdm	2011/02/02	275Y	タミフル治療投与 2011/01/28 から	101.18	10.44	0.52	0.84
A/CHIBA/1017/2009 (H275Y 耐性参照株)	AH1pdm	2009/06/11	275Y		100.66	15.14	0.43	0.89
A/CHIBA/1016/2009 (H275 感受性参照株)	AH1pdm	2009/06/06	275H		0.31	0.12	0.36	0.31
2010/2011 シーズン IC50 平均値 (A/H1N1pdm 感受性株)					0.30±0.07	0.14±0.05	0.44±0.11	0.48±0.12

IV 考察

香川県域における新型インフルエンザの動向は、初発から 2009/2010 シーズンでは、流行規模は相違するが罹患年齢群の変遷する季節性インフルエンザに類似する感染拡大の様相が確認された。また、HI 価の多様性より複数の侵入経路を推測させるとともに、特定地域での限局流行を推察させるなど、新型インフルエンザウイルスの浸淫の足跡が確認され、今後病原性が同等のインフルエンザの発生に対しては同様な流行様式を呈することを示

唆させた。新型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子系統樹解析により、国内外で分離されたすべての株は A/Narita(成田)/1/2009 株およびワクチン株を含む単一のクラスターに属し、遺伝的にも均一であることが示されており<sup>4),5)</sup>、香川県で解析をした 55 全株もワクチン株と単一のクラスターに属していた。

2010/2011 シーズンでは、成人層で 30 歳代の患者が増え、罹患年齢群に変化がみられた。また、系統樹解析の結果、初発から 2009/2010 シーズン分離株と同じクラス

ターに属する株と、ワクチン株に対してやや離れた位置にクラスターを形成している株がみられた。2010/2011シーズン流行株は、ワクチン株の類似株と、抗原性の変異により、遺伝子的に同一系統ではあるが相同性が低下した株が入り混じった流行であると考えられた。

オセルタミビル耐性株については、耐性を疑う検体のうち2検体から耐性マーカーが検出され、薬剤感受性試験でも耐性であった。この患者の周囲で耐性が疑われる患者の発生はなかったため、タミフルを服用したことにより患者体内で薬剤の選択圧により獲得されたものと考えられる<sup>6)</sup>。H275Y 耐性マーカーに加えて I223R にアミノ酸置換を持ったウイルスは、オセルタミビルとペラミビルに高い耐性を持ち、ザラミビルに対しても耐性を持つこともあると報告されている<sup>7)</sup>。しかし、今回の検出された H275Y 耐性株はザラミビルに対しては感受性を保持していた。

今回の新型インフルエンザに対し、当センターでは、情報収集や、関係機関の役割分担、関係の明確化等の危機管理能力を向上させるとともに 24 時間の検査体制を構築するため、保健科学部門の人員及び環境森林部、健康福祉部からも人員を確保し、診断検査技術の研修を実施し、検査体制を確立してきた。WHO では、2010 年 8 月 10 日に新型インフルエンザは、季節性と同等の病原性であり、世界的大流行は終息したとの宣言が出された。その後、厚生労働省は、2011 年 3 月 31 日には、2009 年に猛威をふるった新型インフルエンザについて、感染症法上における「新型インフルエンザ等感染症」と認められなくなったことを発表した。これにより同インフルエンザは、通常の季節性インフルエンザと同様の扱いをされることになり、4 月 1 日からは呼称もインフルエンザ(H1N1) 2009 と変更された。しかし、新型インフルエンザウイルスと H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは交雑しやすいとの報告もあり<sup>8)</sup>、新たな H5N1 の出現に備え、現在の検査体制を維持強化していくことが必要であると思われる。

今後の課題としては、香川県として、感染症担当医や感染症の公衆衛生知識を有する行政官、感染症疫学者等の感染症の専門家の育成を推進する必要がある。

## V まとめ

2009 年 6 月の初発からの新型インフルエンザの県下への浸淫の様相を疫学解析した。

1. 香川県域における新型インフルエンザの動向は、初発から 2009/2010 シーズンでは、罹患年齢群の変遷する季節性インフルエンザに類似する感染拡大の様相が確認された。また、HI 価の多様性より複数の侵入経路を推測させるとともに、特定地域での限局流行を推察させるなど、新型インフルエンザウイルスの浸淫の足跡が確認された。系統樹解析により、初発から 2009/2010 シーズン分離株は、2010/2011 シーズンワクチン株と単一のクラスターに属して、遺伝的にも均一であることが示された。
2. 2010/2011 シーズンでは、罹患年齢群に変化がみられた。系統樹解析の結果、2010/2011 シーズン流行株は、ワクチン株の類似株と、抗原性の変異により遺伝的に同一系統ではあるが相同性が低下した株が入り混じった流行であると考えられた。
3. 今回の新型インフルエンザに対し、当センターは危機管理能力を向上させつつ、検査体制を確立してきた。新型インフルエンザウイルスと H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルスは交雑しやすいとの報告もあるため、新たな H5N1 の出現に備え、現在の検査体制の維持強化していくことが必要であると思われる。

## 文献

- 1) 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 5 月 ver. 1)
- 2) 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)
- 3) 国立感染症研究所：H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法実験プロトコール(2010 年 11 月 ver. 1)
- 4) 国立感染症研究所：＜特集関連情報＞2008/09 シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析，病原微生物検出情報，30(11)，287-297，(2009)。
- 5) 国立感染症研究所：＜特集関連情報＞2009/10 シーズンの季節性インフルエンザおよび新型インフルエンザ分離株の解析，病原微生物検出情報，31(7)，253-260，(2010)。
- 6) 鈴木宏，斉藤玲子，鈴木康司，Zaraket Hassan, Baranovich Tatiana, 田村務，木村義成，山口正浩，関谷庄吉：薬剤耐性 2009 pandemic A (H1N1) ウイルス出現のメカニズム，臨床とウイルス，38(1)，83-88，(2010)。

- 7) 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第一室: 新型インフルエンザ(A/H1pdm) オセルタミビル耐性株(H275Y)の国内発生状況第2報, IASR, (2010). swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. J Virol 84:10918-10922, (2010).
- 8) Octaviani CP, Ozawa M, Yamada S, Goto H, Kawaoka Y. High genetic compatibility between

#### Abstract

The trends for outbreaks of influenza virus AH1pdm in Kagawa Prefecture, from first outbreak up through the 2009/2010 influenza season, have been confirmed as similar to those of regular seasonal influenza, in which the age group of patients affected by the virus infection expansion changes. We can therefore verify the course of the new influenza virus's infection pattern by surmising from the variety of HI values that there were two or more routes of infection involved and that the spread of the virus was limited to a specific geographic area. Genealogical analysis shows that the viruses isolated from the time of the outbreak up through the 2009/2010 season are homogeneous with the 2010/2011 vaccine cluster and that they are hereditarily uniform.

During the 2010/2011 season, the age groups of the patients contracting the virus changed. From the results of the genealogical analysis, it is believed that the virus strains isolated during the 2010/2011 season contained a mix of strains, including those similar to the vaccine strains and those that had a lower degree of homogeneity (despite being of the same genealogy) due to antigenic changes.

The Center has improved its crisis management capabilities in response to this new influenza virus, and it has established a virus inspection system. We believe that it is important to continue to maintain and strengthen the inspection system because there have been reports that the influenza virus AH1pdm and the H5N1 avian flu viruses might be able to hybridize easily and it is necessary to prepare for the emergence of the H5N1 virus.