

太字アンダーライン: ワクチン株  
 ★ : 2010/2011シーズン分離株  
 ▲ : 2011/2012シーズン分離株  
 ● : 2012/2013シーズン分離株

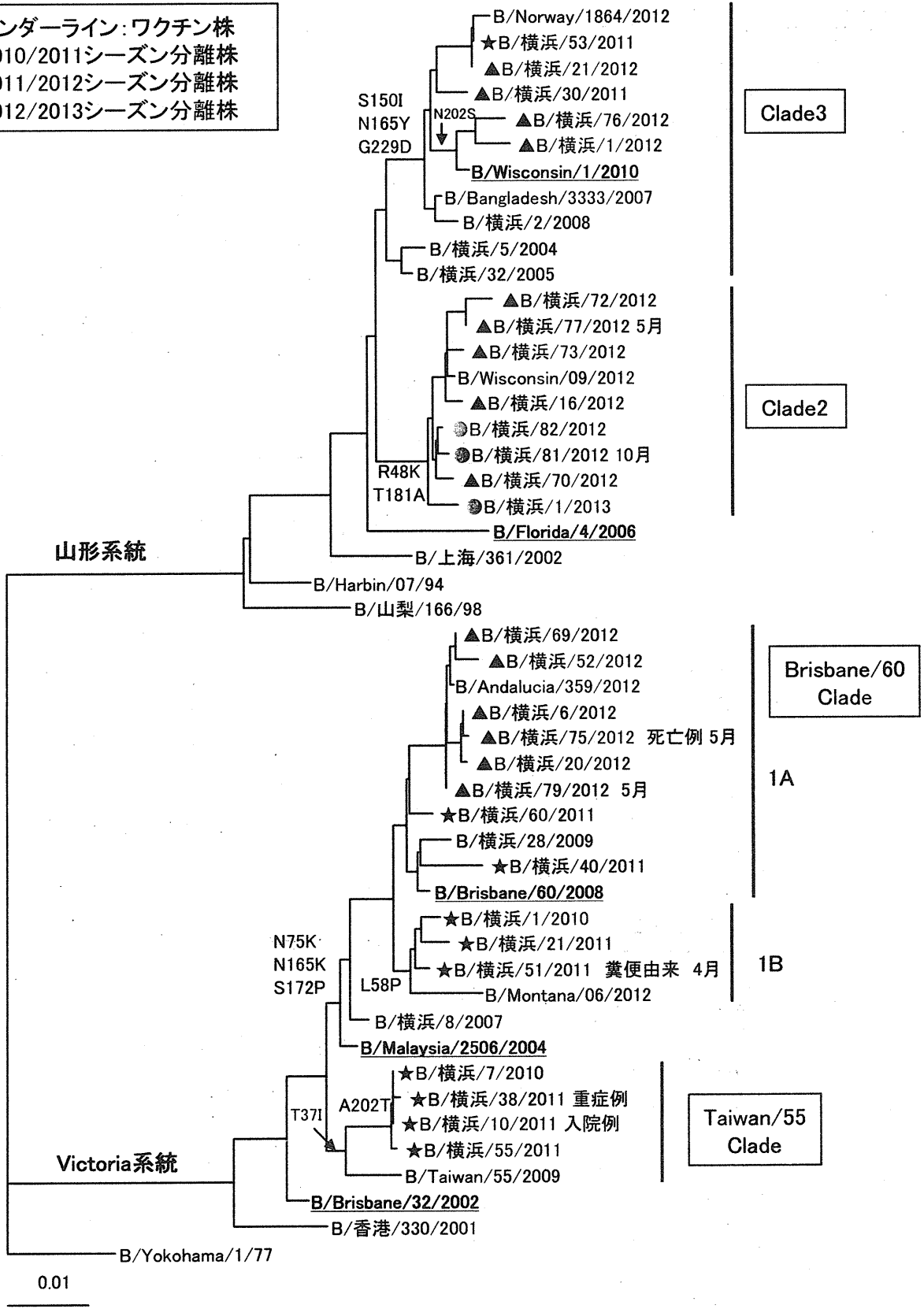


図3 B型ウイルスのHA1ポリペプチド(1041bp)のNJ系統樹

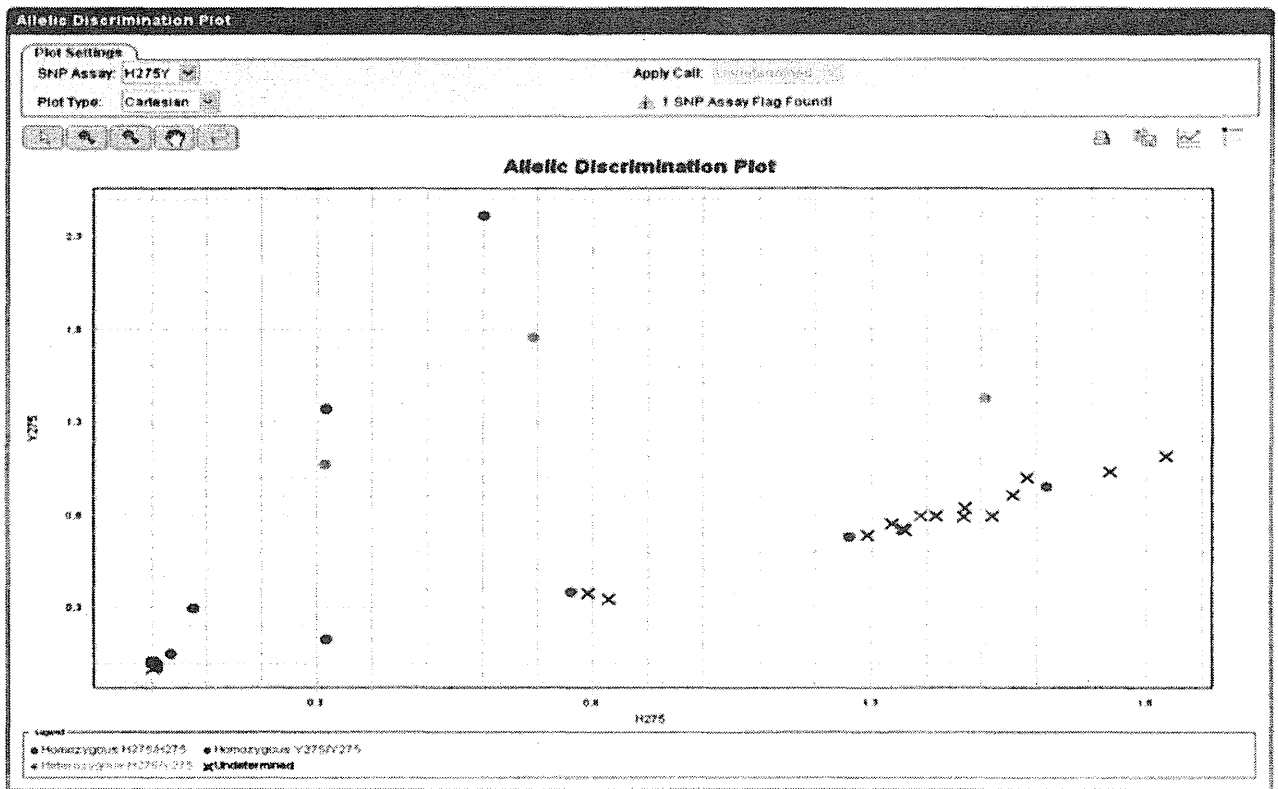


図 4 AH1N1pdm09 ウイルスの TaqMan Probe 法による H275Y 耐性変異株検出結果

表 2 薬剤感受性試験結果(インフルエンザセンター実施)

症例	ウイルス株名	オセルタミビル	ペラミビル	ザナミビル	ラニナミビル
1	A/横浜/29/2011 H275Y ペラミビル耐性	188.04	6.23	0.36	0.43
2	A/横浜/31/2011 H275Y オセルタミビル耐性	49.6	2.03	0.31	0.35
3	A/横浜/84/2011 H275Y オセルタミビル耐性	0.88	0.05	0.31	0.22
	2010/2011シーズン 平均値	0.85±0.12	0.08±0.02	0.32±0.12	0.19±0.01

\*MUNANA基質を用いた蛍光法による測定

症例	ウイルス株名	オセルタミビル	ペラミビル	ザナミビル	ラニナミビル
4	A/横浜/97/2010 R292K オセルタミビル耐性	2722.4	19.02	6.37	3.04
	2010/2011シーズン 平均値	0.22±0.11	0.22±0.06	0.83±0.22	1.20±0.43

\*NA-Star基質を用いた化学発光法による測定

ペラミビル耐性変異株はオセルタミビルに対し交叉耐性を示し、オセルタミビル耐性変異株もペラミビルに対し交叉耐性を示した。

感受性株と耐性変異株の混合比により、IC50 値の上昇が認められない株もあった。

AH3 ウイルスの R292K 変異株はオセルタミビルに対し 1 万倍と高度耐性で、他の 3 剤についても感受性の低下がみられた。

ペラミビルに対する IC50 値が感受性参照株より約 60 倍上昇し、オセルタミビルに対しても約 260 倍上昇しており、両薬剤に対する感受性が低下していた。

症例 2 ではオセルタミビルに対する IC50 値が感受性参照株より約 68 倍上昇し、ペラミビルに対しては約 20 倍上昇しており、両薬剤に対する感受性が低下していた。

オセルタミビル投与後の重症例ではオセルタミビルやペラミビルに対して IC50 値の上昇が認められなかった。

Mix 株の IC50 値は、275H と 275Y ウイルスの混合比 あるいは各々の NA 活性の強さに影響を受けることが考えられた。

オセルタミビルに対する IC50 値が感受性参照株より約 1 万倍上昇し、他の 3 剤についても感受性の低下がみられた。

表 3 糞便由来検体からのインフルエンザ分離・検出事例

症例No	分離・検出ウイルス	採取日	年齢	性別	診断名	発熱	臨床症状	検体	Realtime-PCR Ct値*	LAMP**
1	AH1pdm09(LAMP)/ Noro-G2(PCR)	2010/11/20	2y10m	男	急性腸炎	不明	下痢・嘔吐	糞便	陰性	+
2	AH1pdm09(LAMP)/ Noro-G2(PCR)	2010/12/18	5y	男	ウイルス性胃腸炎	不明	下痢・嘔気・嘔吐	糞便	陰性	+
3	AH1pdm09(LAMP)/ Noro-G2(PCR)	2011/1/11	1y1m	女	ウイルス性胃腸炎	不明	下痢・嘔気・嘔吐	糞便	AH1pdmのみ: 38.27	+
4	AH1pdm09(LAMP)/ Rot-A(PCR)	2011/4/8	不明	女	ウイルス性胃腸炎	38.7	下痢・嘔気・嘔吐	糞便	陰性	+
5	inf.B(Victoria)分離	2011/4/9	1y3m	男	急性腸炎	38	下痢	直腸ぬぐい液	B: 26.69	/
6	inf.AH3(PCR)	2012/1/16	0y6m	男	急性胃腸炎	不明	上気道炎・下痢	腸内容物	TypeA: 38.06 AH3: 39.35	/
7	inf.AH3(PCR)	2012/5/7	1y0m	男	ウイルス性胃腸炎	不明	下痢・嘔吐	糞便	TypeA: 37.79 AH3: 35.96	/
8	inf.AH3N2分離/ Noro-G2(PCR)	2013/12/9	1y3m	男	急性腸炎	不明	下痢・嘔吐	直腸ぬぐい液	陰性	/
9	AH3(PCR)	2013/12/25	不明	女	嘔吐症	39.5	嘔吐	腸内容物	TypeA: 38.93 AH3: 30.06	/

\*Ct 値 : Threshold Cycle

\*\*Loop-Mediated Isothermal Amplification 法

## A 型インフルエンザウイルス市中流行株の抗原性、薬剤耐性変異等の把握に関する研究

研究分担者 愛知県衛生研究所 皆川 洋子  
研究協力者 愛知県衛生研究所 安井善宏、中村(藤原)範子、小林慎一、山下照夫、  
藤浦 明、平松礼司

### 研究要旨

平成 22 年度に構築されたコア・サポート地衛研体制において東海・北陸ブロックのコア地衛研を担当し、インフルエンザウイルス・サーベイランスの維持強化を図るとともに、インフルエンザウイルスの重大な変異（抗原性、薬剤耐性等）の迅速・正確な把握に努めた。研究期間内には特に以下の 3 点に力点を置いた。

#### (1) オセルタミビル感受性サーベイランスの実地検証と実施

研究分担者の高下博士、影山博士らが新たに開発したリアルタイム RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異 (H275Y) 検出システムの実地検証を担当した。システムの標準化後は実際にサーベイランスを実施した。

#### (2) 外部精度管理評価試行への協力

研究分担者の影山博士らが開発したリアルタイム RT-PCR を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査の外部精度管理評価手法の実地試行を担当した。

#### (3) 本県におけるインフルエンザウイルス市中流行株の性状解析及び分子疫学的解析

インフルエンザウイルスサーベイランスにおいて得られたウイルス A 型インフルエンザウイルス市中流行株の抗原性及び薬剤感受性等について、性状の把握及び変化の監視を行った。また、分子疫学的手法により県内分離ウイルスの解析を行った。

### A. 研究目的

2009 年における AH1N1pdm2009 によるインフルエンザパンデミックの発生以降、新型インフルエンザの確定検査が全国地方衛生研究所（地衛研）において迅速に行うことが求められている。新型インフルエンザ発生時に直ちに核酸検査を実施するためには平常時から検査技術及び精度を維持しておく必要がある。また、日本は世界有数の抗インフルエンザ薬使用国であることから、国内における薬剤耐性株の発生状況を迅速に把握する必要がある。このため地衛研では 2009/10 シーズンから AH1N1pdm2009 分離株に対してオセルタミビル感受性サーベイランスを実施している。そこでインフルエンザウイルス検

出精度の向上を図り、効果的なサーベイランスを実施するため、サーベイランスに用いる遺伝子変異の検出手法や検査精度の管理手法の開発・改良を国立感染症研究所との連携に基づいて行うことを目的とする。

地衛研では流行するインフルエンザウイルスの重大な変異（抗原性や薬剤耐性）を迅速かつ正確に把握するためにウイルス分離を行い、分離株の性状解析を行っている。本県においても抗原性や薬剤感受性等の変化を把握する目的で、最近の流行シーズンから分離された A 型インフルエンザウイルスについて性状解析を行った。

### B. 研究方法

1) オセルタミビル感受性サーベイランスの  
実地検証と実施：研究分担者の高下博士、  
影山博士らが新たに開発したリアルタイム  
RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異  
(H275Y) 検出システムについて AH1N1pdm2009  
ウイルス臨床分離株を用いて実地検証する。  
①従来法（シーケンス法）との比較検討。  
②RNA 抽出作業の省略が可能かどうかの検討。  
試験法の標準化後には実際にリアルタイム  
RT-PCR 法でサーベイランスを実施する。  
2) 外部精度管理評価：影山博士らが開発した  
リアルタイム RT-PCR を用いたインフルエンザ  
ウイルスの核酸検出検査の外部精度管理  
評価手法の実地検証を行う。  
3) インフルエンザウイルスの性状解析及び  
分子疫学的解析：インフルエンザウイルス流  
行株の分離及びサーベイランスキットによる  
型別同定を実施し、A 型インフルエンザウ  
イルス分離株の一部について HA 遺伝子及び  
NA 遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹解析  
を行う。

（倫理面への配慮）

本研究で用いる臨床検体及び患者情報は、  
「疫学研究における倫理指針」に基づき、材  
料提供者および家族の個人の尊厳及び人権  
の尊重、個人情報保護に配慮して実施する。  
症例の分析においては、個々の症例が特定で  
きないように配慮して行う。

### C. 研究結果

1) オセルタミビル感受性サーベイランスの  
実地検証と実施：リアルタイム RT-PCR 装置  
の機種により異なるマニュアルが準備され  
たため、本県では Roche LightCycler480II  
を用いて実地検証を行った。リアルタイム法  
による解析には従来のシーケンス法と同  
等若しくはそれ以上の感度及び精度を認め  
た。感受性（H275）と耐性（Y275）の両者が  
混合した状態の分離株は、混合株として正し  
く判定することが可能であった。またウイル  
ス分離培養上清を希釈する等の検討を行っ  
たところ培養上清中の夾雑物の影響を軽減  
が可能であることが判明し、結果として分離  
株を検査材料として用いる場合には RNA 抽  
出作業の省略が可能と考えられた。

試験法の標準化後は同方法にてサーベイラ  
ンスを実施した。2010/11 シーズンは 67 株  
の AH1N1pdm2009 ウイルス株から 1 株の耐性  
株を検出した。2011/12 シーズンはウイルス  
分離実績が無かったため、耐性株の検出はな  
かった。2012/13 シーズンは 2013 年 1 月末  
現在、1 株の AH1pdm09 ウイルス株の検査を  
行ったが感受性であった。検出された耐性株  
は治療目的でタミフル投与後、薬剤耐性を疑  
った患者検体より分離された株であった。

2) 外部精度管理評価：2011 年 8 月及び 2012  
年 11 月に AH5 亜型インフルエンザウイル  
スの検出を想定したリアルタイム RT-PCR 検査  
の外部精度管理を実施した。

3) ①AH1N1pdm2009 発生時から 2012/13 シー  
ズン（2013. Jan. 現在）に分離された  
AH1N1pdm2009 ウイルス株について HA 遺伝子  
の系統樹解析を行った（図 1）。発生時から  
2009/10 シーズンに得られた分離株のほとん  
どは A/California/7/2009 株と比べ S203T の  
特徴的なアミノ酸置換を有していた。  
2010/11 シーズンの分離株はクレード 7  
（S185T、A197T、E374K、S451N）とクレード  
3（A134T、S183T）に分類された。2011/12  
シーズンは分離株が得られなかったが、  
2012/13 シーズンに得られた 1 株はクレード  
6（D97N、H138R、S185T、V249L）に分類され  
た。AH1N1pdm09 分離株はニワトリ、ガチョ  
ウ、モルモット赤血球を用いた HA 試験では  
HA 価が低く、サーベイランスキットによる  
型別同定が困難であった。HI 試験が可能だ  
った分離株に抗原性の違いはなく、すべてワ  
クチン株 A/California/7/2009 類似株だっ  
た。

②2010/11 シーズン～2012/13 シーズン  
（2013. Jan. 現在）に分離された AH3N2 ウイ  
ルス株について HA 遺伝子の系統樹解析を行  
った（図 2）。2010/11 シーズンの分離株は主  
に Perth16/クレード（E62K、N144K）と  
Victoria/208 クレード（T212A）のサブクレ  
ード 5 若しくは 6（D53N、Y94H、I230V、E280A）  
に属していた。2011/12 シーズンの分離株は  
Victoria/208 クレードのサブクレード 3B  
（A198S、N145S）と 3C（A198S、S45N、T48I）  
に属していた。サブクレード 3C に属する分

分離株のほとんどは全国で分離されていた株と同様に Q33R、N278K のアミノ酸置換を併せ持っていたが、これらの置換がなく N145S、K2Q、T128S、I140M のアミノ酸置換を有する株 (A/Aichi/280/2011 及び A/Aichi/5/2012) も得られた。これまでに得られた AH3 分離株は AH1N1pdm09 分離株と同様に HA 価が低くサーベイランスキットによる型別同定が困難だった。HI 試験が可能だった分離株に抗原性の違いは無かったが、A/Victoria/210/2009 ワクチン株と HI 価で 4 倍の反応性低下を示した分離株が存在した。これらの分離株はサブクレード 3C に属し F193S の分岐を持っていた。この 193 番のアミノ酸は HA1 分子のレセプター結合部位近傍に存在するため、このアミノ酸変異により抗原性の低下を引き起こしたと考えられた。2012/13 シーズンの分離株は Victoria/208 クレードのサブクレード 3C に属しており、更に N415S のアミノ酸置換を有していた。

#### D. 考察

- 1) 新たに開発されたリアルタイム RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異 (H275Y) 検出法についてシーケンス法と比較したところ同等に検出が可能であった。また、分離培養上清の検討から、分離株を検査材料として用いる場合には、分離培養上清の希釈を行う等のマニュアル改良に反映させることができた。
- 2) 外部精度管理評価結果から定期的に精度管理を行うことは検査技術、検査精度の維持に有用であると考えられた。
- 3) ① AH1N1pdm2009 ウイルスは発生から 4 シーズン目となり、シーズンを経過したウイルスの HA 遺伝子内に塩基置換が蓄積されてきたと考えられる。県内で得られた分離株は抗原性に変化は認められなかったが、系統樹解析の結果からシーズン毎にクレードの異なるウイルスが主に流行していたと考えられた。オセルタミビル耐性株は 6 株を分離しているが、系統樹解析では耐性株が特定の集団を形成することはなかった。
- ② 県内で分離された AH3 ウイルス株は A/Victoria/210/2009 ワクチン株と抗原性に

違いは認められなかったが、2011/12 シーズン分離株の中には HI 価で 4 倍反応性が低い分離株が認められた。同シーズンに全国から分離されるサブクレード 3C 株の中には同ワクチン株から抗原性が変化している株が存在しており、これらの株は 2012/13 シーズンワクチン株 A/Victoria/361/11 類似株であった。このことから、県内分離株も同様に抗原性が変化した可能性が考えられた。系統樹解析の結果から、流行するウイルス株のクレード若しくはサブクレードが昨シーズンまではシーズン毎に変化していたが、2012/13 シーズンは前シーズン同様のサブクレード 3C が分離されている。2012/13 シーズンのワクチン株がサブクレード 3C に属する A/Victoria/361/11 株に変わったことから今後の AH3 ウイルスの変化が注目される。

#### E. 結論

- ・リアルタイム RT-PCR を用いたオセルタミビル耐性変異 (H275Y) 検出システムの実地検証 (マニュアル試用及び従来法との比較を含む検討) を担当した。分離培養上清の検討等によりマニュアルの改良に寄与した。システムの標準化後は実際にサーベイランスを実施し、本県では耐性株を 1 株検出した。
- ・インフルエンザウイルス核酸検査精度管理の実地試行を担当した。今後、全国地衛研で実施するにあたり有用な情報を提供することができた。
- ・流行する A 型インフルエンザウイルスの抗原性及び薬剤感受性について性状把握を行った結果、抗原性が大きく変異した株や伝播性を獲得した薬剤耐性株などは県内の分離株から検出されなかった。
- ・A 型インフルエンザウイルス市中流行株について分子疫学的解析を行ったところ、県内において流行の主流となるウイルスは、シーズン毎に異なるグループに属していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、藤浦明、皆川洋子. 小学校集団発生

から分離された B 型インフルエンザウイルス (Victoria 系統) - 愛知県。病原微生物検出情報 31(6):173, 2010.

- 2) 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、平松礼司、皆川洋子。 2011/12 シーズン用同定キットの赤血球凝集抑制活性が低いインフルエンザウイルス AH3 亜型分離株 - 愛知県。病原微生物検出情報 33(3):67-68, 2012.

## 2. 学会発表

- 1) 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、藤浦明、皆川洋子 愛知県で分離した新型インフルエンザウイルス AH1pdm の分子疫学的解析 第 58 回日本ウイルス学会 学術集会 徳島 2010 年 11 月
- 2) 藤原範子、安井善宏、秦眞美、(ほか 6 名)、皆川洋子 新型インフルエンザ (AH1pdm) 第一波のウイルス性状解析 平成 22 年度愛

知県公衆衛生研究会 愛知県大府市 2011 年 1 月

- 3) 安達啓一、安井善宏、(他 7 名)、皆川洋子 呼吸器系ウイルスの検出法に関する研究 平成 23 年度愛知県公衆衛生研究会 愛知県大府市 2012 年 1 月
- 4) 安井善宏、藤原範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子 愛知県で分離したインフルエンザウイルス AH3 の分子疫学的解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 大阪 2012 年 11 月

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。



図1 AH1N1pdm09  
ウイルス株HA遺伝子の  
系統樹解析

無印: 発生時～2009/10シーズン

太字: 2010/11シーズン

**太字**: 2012/13シーズン

\*: オセルタミビル耐性株

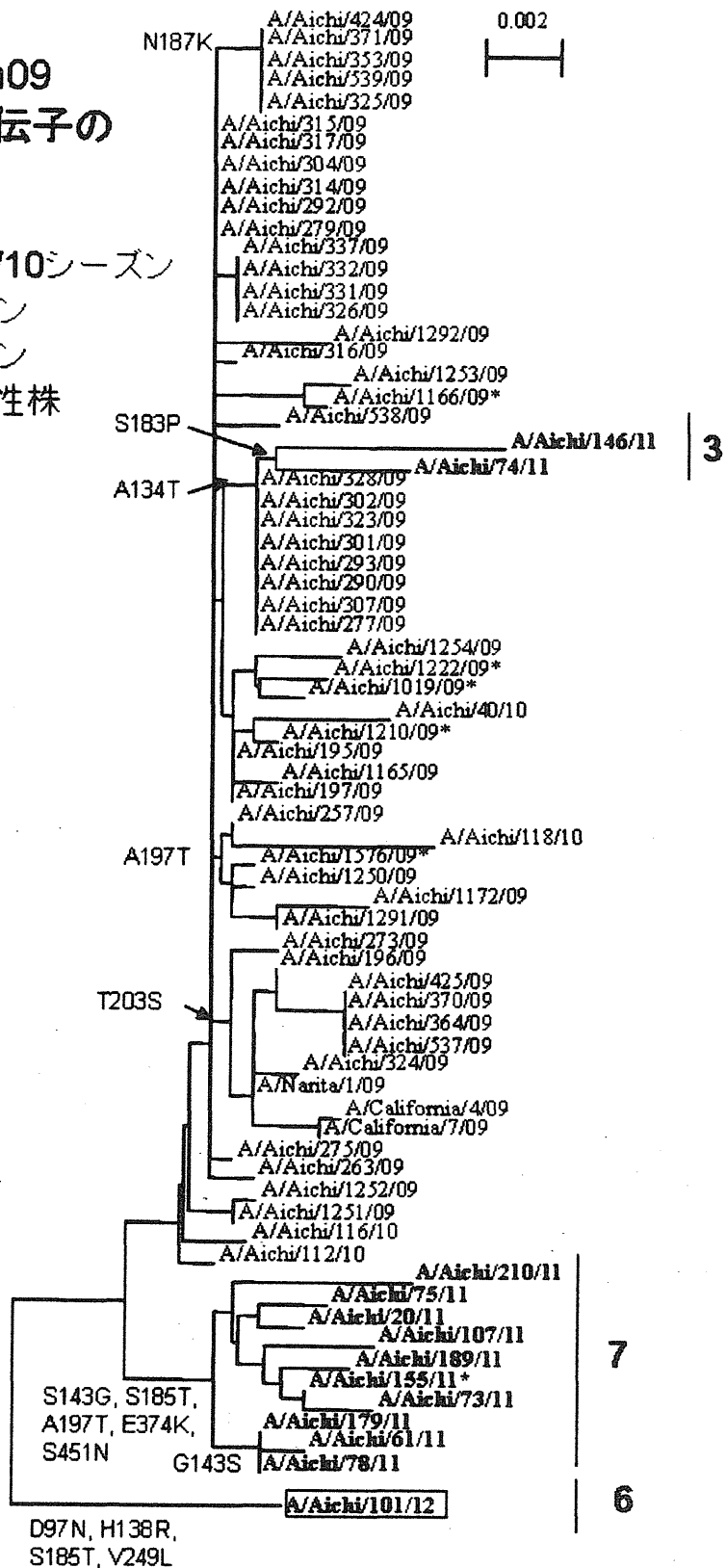
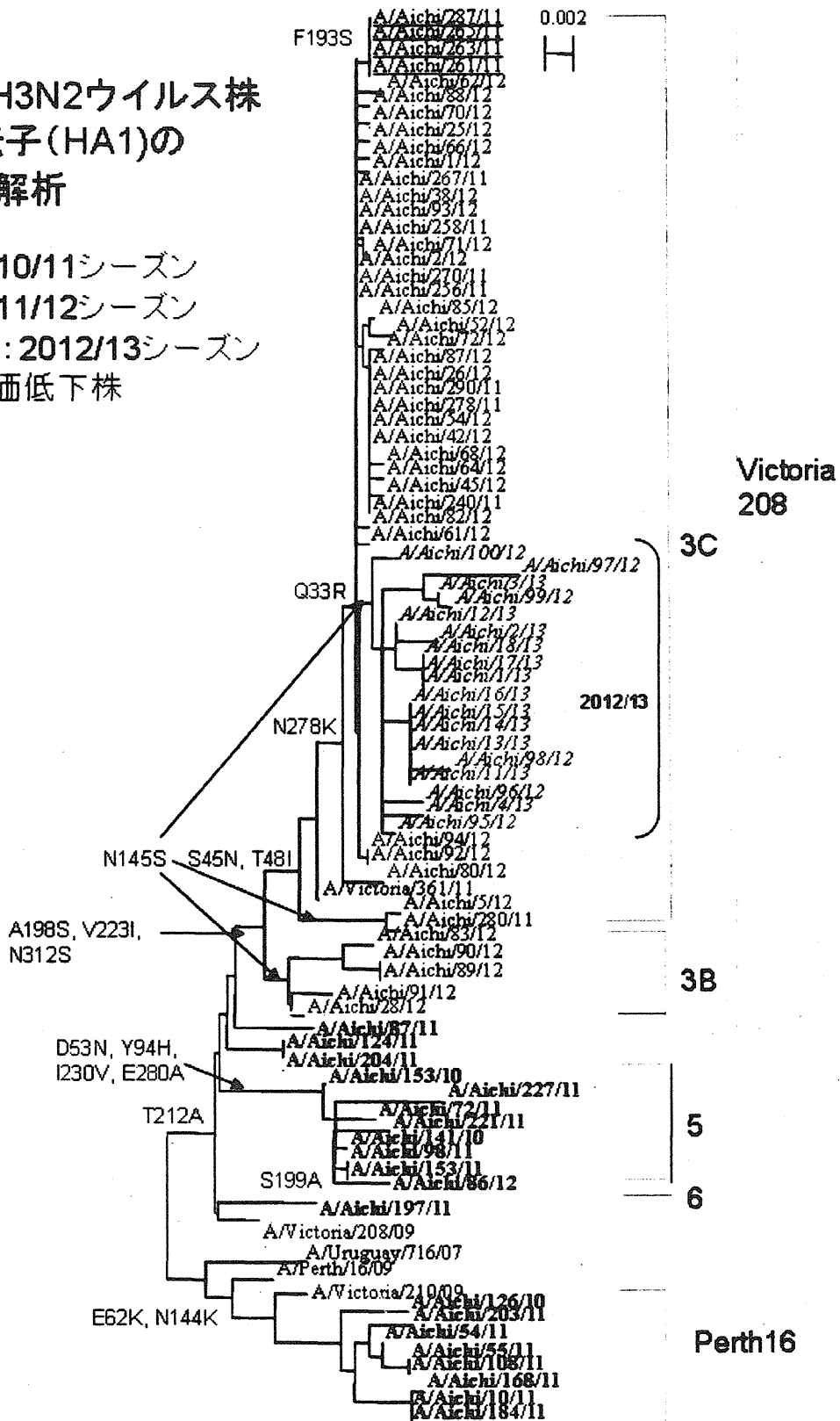


図2 AH3N2ウイルス株  
HA遺伝子(HA1)の  
系統樹解析

太字: 2010/11シーズン  
無印: 2011/12シーズン  
イタリック: 2012/13シーズン  
下線: HI価低下株



## 堺市におけるインフルエンザサーベイランス、及び 2011/12～ 2012/13 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス株の 解析

研究協力者 堺市衛生研究所 内野清子、田中智之

### 研究要旨

堺市におけるインフルエンザ患者発生状況、インフルエンザウイルス分離・検出状況の調査研究結果を記した。これら分離ウイルス株を詳細に解析し、AH3 株における HA 価、インフルエンザウイルス抗原性について検討した。

### 研究結果

#### 1. 堺市におけるインフルエンザ患者発生状況

2011/12 シーズンは堺市感染症発生動向調査では定点あたり週別患者数は 2011 年第 49 週に 1.0 を超え、流行期間は 2012 年第 17 週までの 22 週間であった。流行のピークは 2012 年第 5 週定点あたり 46.21 で、全国のピーク 42.62 より高い数値を示した。

2012/13 シーズンは 2012 年第 51 週に定点あたり患者数が 1.0 を超えたが、全国よりも 2 週遅い立ち上がりであった。また、全国では 2013 年第 5 週に警報レベルを超えたが、当市では 2013 年第 5 週現在警報レベル以下で推移している。

#### 2. インフルエンザウイルス分離・検出状況（図 1.）

2011/12 シーズンは AH3 が 17（分離 16）、B Yamagata 系統株が 14（分離 14）、B Victoria 系統株が 5（分離 5）、合計 36 が検出および分離された。AH3 が 47%、B 型が 53%と A 亜型と B 型はほぼ同じ割合となり、AH1pdm09 の分離はなかった。2012/13 シーズンは 2 月 13 日現在 AH3

亜型が 10、B Victoria 系統株が 1、合計 11 株分離され、AH3 が流行優位株であったが、今シーズンにおいても現在のところ AH1pdm09 は分離されていない。

#### AH3 分離株における HA 価

2011/2012 および 2012/13 シーズンに分離された AH3 の HA 価の分布を示す（表 1.）。HA 価測定にはモルモット赤血球を用い、4℃にて反応後判定した。2011/12 シーズンでは HA 価は 8 以上ありすべて HI 試験にて型別判定できたが、2012/13 シーズンは HA 価が低い分離株が 2（25%）あり、リアルタイム RT-PCR 法にて型別判定した。当所における AH3 の HA 価減少は手技の問題なのか分離株の性状変化なのか判別がつかないが、今後の検査状況に注意していく必要がある。

#### 3. 2012/2013 インフルエンザウイルス抗原性

国立感染症研究所から配布された 2011/13 シーズン用インフルエンザ同定キットを用いた赤血球凝集抑制試験では分離された AH3 および B Victoria 系統株ともワクチン類似株であった。

## 考察

インフルエンザサーベイランスの必要性：当市では、インフルエンザシーズンには定点医療機関から「インフルエンザ毎日報告」を導入している。しかし、新型インフルエンザが発生した2009/10 シーズンから時間の経過とともに、感染症発生動向調査におけるインフルエンザ検体採取などに消極的な現状でみられている。インフルエンザ流行把握や次なる新型インフルエンザへの対応のためにも常日頃の通常サーベイランスが重要である。関係各所と連携し感染症発生動向調査事業に対する理解と協力を今一度得られるよう努めたい。

## 研究発表

### 1. 論文発表

1) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, Tanaka T, Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T.

Histopathological and immunohistological findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Modern Pathology* 25(1) 1-13, 2012

2) 内野清子、三好龍也、西口智子、岡本文香、吉田永祥、沼田富三、田中智之

2011/12シーズン初めに分離されたB型インフルエンザウイルス(山形系統)  
— 堺市 病原微生物検出情報 32(12), 366, 2011

### 2. 学会発表

1) 田中智之、齋藤博之、新聞敬行、倉

田 毅、皆川洋子、高橋和郎、調 恒名、平良勝也

Ligase Chain Reaction(LCR)法を用いた簡便なオセルタミフル耐性鑑別法の開発

第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010

2) 西口智子、内野清子、三好龍也、佐多徹太郎、田中智之

新型インフルエンザ関連死亡例の検討  
第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010

3) 田中智之、調 恒名、浅利誠志、村瀬充範、和山行正

教育シンポジウム；本邦における感染症検査機関：大学附属病院/民間検査機関/地方衛生研究所におけるBSL整備状況、検査対象ウイルス及び検査内容の現状について

第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2102.

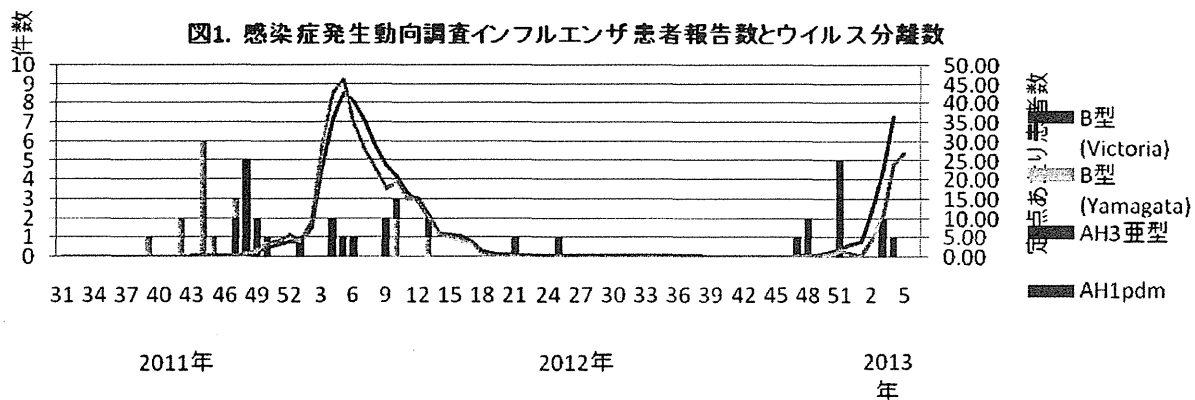


図1. 感染症発生動向調査インフルエンザ患者報告数とウイルス分離数（堺市）

表 1. AH3 分離株における HA 価

	HA 価 (0.75%モルモット赤血球)							計
	<2	2	4	8	16	32	64	
2011/12	0	0	0	4	2	3	7	16
2012/13	1	1	0	2	2	2	0	8

## 沖縄県において2011/12シーズンに検出されたAH3亜型インフルエンザ分離株のHA1遺伝子解析からみた動向

研究協力者 沖縄県衛生環境研究所 平良 勝也 喜屋武向子 久場由真仁

### 研究要旨：

2011/12シーズンの冬季～夏季に検出されたAH3亜型インフルエンザウイルスの動向を遺伝子レベルで把握するため、分離ウイルス株についてHA1遺伝子の系樹統解析を行った。その結果、解析した分離株はすべてVictoria/208クレードに属したが、1月～5月と6月～8月で異なる2つのクラスターを形成した。この結果は、冬季に流行したAH3亜型は5月頃に一旦終息し、6月頃新たにAH3亜型が県外から持ち込まれ、夏季流行の発端となった可能性を示唆した。

### A. 研究目的

わが国におけるインフルエンザは、一般的に12月～3月の冬季に流行するが、沖縄県では2005年から毎年、6月～8月の夏季にも流行が観察されるようになり、二峰性の流行パターンが定着している。また、最近では一年を通してインフルエンザ患者が報告され、インフルエンザウイルスはシーズンをとおして検出・分離されている。このような流行状況は国内でも特異であり、本県におけるインフルエンザサーベイランスは極めて重要と考える。本研究では、2011/12シーズンの冬季～夏季に検出されたAH3亜型インフルエンザウイルスの動向を遺伝子レベルで把握するため、分離ウイルス株についてHA1遺伝子の系樹統解析を行った。

### B. 研究方法

2011/12シーズンに、MDCKまたはCaco2を用いて検出・同定されたAH3亜型インフルエンザウイルス株のうち、1月1株、2月1株、4月1株、5月1株、6月2株、7月1株、8月1株、合計8株について解析した。ウイルス分離同定、RT-PCR、HA1

遺伝子解析（増幅プライマー、PCR条件およびシーケンスプライマー等）はインフルエンザ診断マニュアル第2版（平成24年3月：国立感染症研究所）に基づいて実施した。

### C. 研究結果

2011/12シーズンの定点当たり患者報告数およびインフルエンザウイルス検出状況を図1に示した。患者報告数は、2011年12月上旬（第50週）から増加し2012年第6週には定点あたり35.72でピークとなり、その後は一旦減少したが再び第23週から増加し、第29週に定点あたり21.1で2回目のピークを示した。2011/12シーズン（2011年第36週～2012年第35週）の総分離・検出数は175株でAH3亜型は125株（71%）、B型は49株（28%）、AH1pdm09は1株（0.5%）であった。AH3亜型は2回の流行で主流であった。

1月～8月に分離したAH3亜型インフルエンザウイルス8株について、HA1遺伝子系統樹解析を行った。その結果、解析した分離株はすべてVictoria/208クレードに属したが、1月～5月と6月～8月

で異なる 2 つのクラスターを形成した (図 2)。

#### D. 考 察

2011/12 シーズンのインフルエンザの流行曲線は、冬季と夏季にピークがみられる二峰性を示した。一回目のピーク時は AH3 亜型が主流で、ピークの谷間では B 型、二回目のピーク時は再び AH3 亜型が主流となった。分離した AH3 亜型の HA1 遺伝子の系統樹解析により、冬季～春季 (1 月～5 月) と夏季 (6 月～8 月) の分離株は、それぞれ異なるクラスターを形成することが明らかになった。この結果は、冬季に流行した AH3 亜型は 5 月頃に一旦終息し、6 月頃新たに AH3 亜型が県外から持ち込まれ夏季流行の発端となった可能性を示唆した。

国立感染症研究所 (感染研) の報告 (IASR:2012 年 11 月号) によると、2011/12 シーズンに国内で分離された A (H3N2) ウイルス株は Victoria/208 クレードに属し、さらにサブクレード 3～7 に区分され、3 はさらにサブクレード 3A、3B、3C に区分されることが報告されている。本研究で解析した AH3 亜型のウイルス株の一部を感染研に送付し詳細に解析したところ、1 月～5 月に分離されたウイルス株はサブクレード 5 に属し、6 月～8 月に分離されたウイルス株はサブクレード 3C に属していた。サブクレード 5 と 3C には他県で

の分離株も含まれており (IASR:2012 年 11 月号)、感染研での詳細な解析においても本県の分離ウイルスが他県と比べて、抗原性や遺伝子レベルで大きな違いを示すデータは得られていない。したがって、ウイルス側の要因だけで夏季流行が起きている可能性は考えにくい。インフルエンザの夏季流行の要因は未だよくわかっていないが、関連する流行要因を解明するためにも、本県のサーベイランスを継続していくことが重要と考えられた。

#### E. 結 論

2011/12 シーズンの冬季～夏季に検出された AH3 亜型インフルエンザウイルスの動向を遺伝子レベルで把握するため、分離ウイルス株について HA1 遺伝子の系統樹解析を行った。その結果、解析した分離株はすべて Victoria/208 クレードに属したが、1 月～5 月と 6 月～8 月で異なる 2 つのクラスターを形成した。この結果は、冬季に流行した AH3 亜型は 5 月頃に一旦終息し、6 月頃新たに AH3 亜型が県外から持ち込まれ、夏季流行の発端となった可能性を示唆した。

#### F. 参考文献

1. IASR 33:288-294, 2012

#### G. 研究発表

なし。

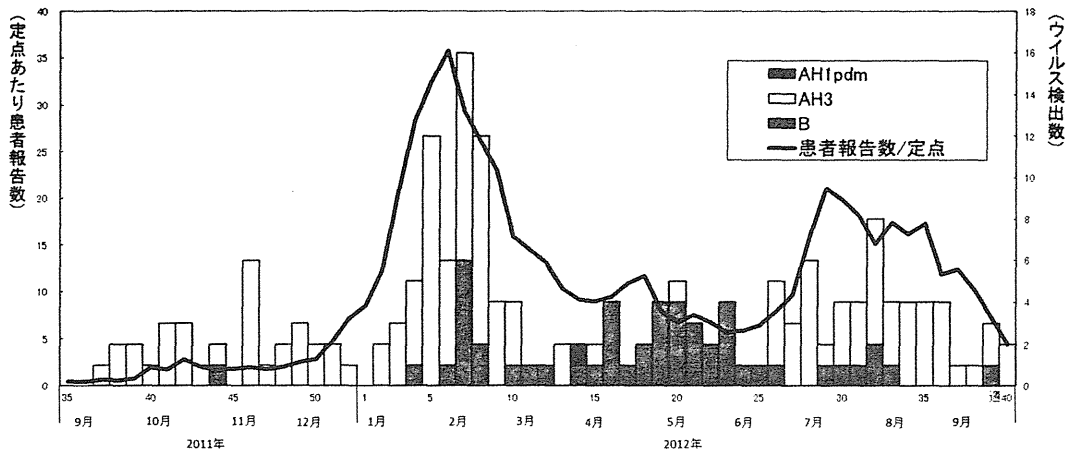


図1. 定点あたり患者報告数・ウイルス検出数

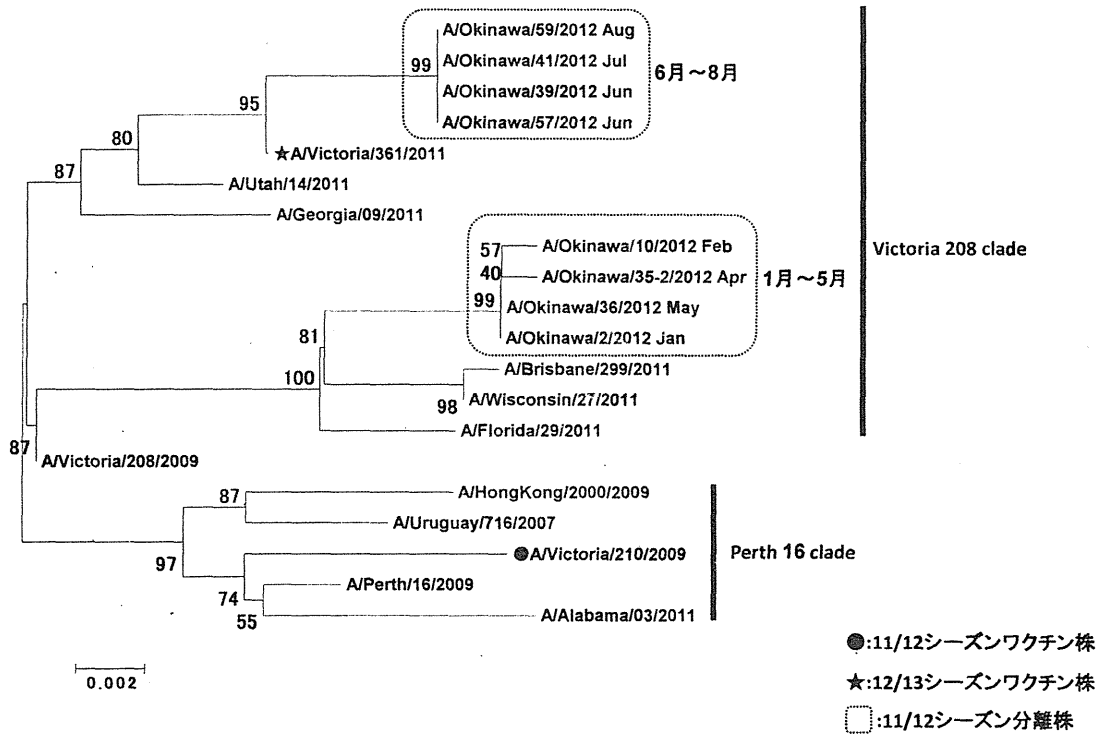


図2. AH3亜型ウイルスHA1遺伝子の系統樹解析(987bp)



#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 該当なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ujike, M., Shimabukuro, K., Mochizuki, K., Obuchi, M., Kageyama, T., Shirakura, M., Kishida, N., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Fujita, N., Tashiro, M., Odagiri, T. and the Working Group for Influenza Virus Surveillance in Japan	Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during 2007-2009 influenza seasons, Japan.	<i>Emerg. Infect. Dis.</i>	16	926-935	2010
Matsuzaki Y, Mizuta K, Takashita E, Okamoto M, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, Nagai Y, Nishimura H.	Comparison of virus isolation using the Vero E6 cell line with real-time RT-PCR assay for the detection of human metapneumovirus.	<i>BMC Infectious Diseases</i>	10	170	2010
Shiino T, Okabe N, Yasui Y, Sunagawa T, Ujike M, Obuchi M, Kishida N, Xu H, Takashita E, Anraku A, Ito R, Doi T, Ejima M, Sugawara H, Horikawa H, Yamazaki S, Kato Y, Oguchi A, Fujita N, Odagiri T, Tashiro M, Watanabe H.	Molecular evolutionary analysis of the influenza A(H1N1)pdm, May-September, 2009: temporal and spatial spreading profile of the viruses in Japan.	<i>PLoS One.</i>	5	e11057	2010
Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Nishimura H, Matsuzaki Y.	Longitudinal course of human metapneumovirus antibody titers and reinfection in healthy adults.	<i>Journal of Medical Virology</i>	82	2092-2096	2010
Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, Shirabe K, Fukano R, Ichiyama T.	Characteristics of atopic children with pandemic H1N1 influenza viral infection: pandemic H1N1 influenza reveals 'occult' asthma of childhood.	<i>Pediatric Allergy and Immunology</i>	22(1)	119-123	2011

Hasegawa S, Matsushige T, Inoue H, <u>Shirabe K</u> , Fukano R, Ichiyama T.	Serum and cerebrospinal fluid cytokine profile of patients with 2009 pandemic H1N1 influenza virus-associated encephalopathy.	Cytokine	54(2)	167-172	2011
Nakajima N, Sato Y, Katano H, Hasegawa H, Kumasaka T, Hata S, Tanaka S, Amano T, Kasai T, Chong JM, Iizuka T, Nakazato I, Hino Y, Hamamatsu A, Horiguchi H, <u>Tanaka T</u> , Hasegawa A, Kanaya Y, Oku R, Oya T, Sata T	Histopathological and immunohistological findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection	Modern Pathology	25(1)	1-13	2011
Nakaya H, Yamamoto T, Takano M, Yamamoto K, Hujikawa Y, <u>Morikawa S</u> , <u>Kase T</u> , Shimotsuji T.	Alice in Wonderland syndrome caused by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus.	Pediatric Infectious Disease Journal	30 (8)	725-726	2011
Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Shor R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S.	Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle.	Journal of Virology	85	1322-1329	2011
M.Ozawa, ST.Victor, AS.Taft, S.Yamada, C.Li, M.Hatta, SC.Das, E.Takashita, S.Kakugawa, EA.Maher, G.Neumann and Y.Kawaoka.	Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene.	Journal of General Virology	92	2879-2888	2011
M.Nakauchi, M.Ujike, M.Obuchi, E.Takashita, I.Takayama, M.Ejima, K.Oba, N.Konomi, T.Odagiri, M.Tashiro, T.Kageyama and the influenza virus surveillance group of Japan.	Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay.	Journal of Medical Virology	83	1121-1127	2011
Obuchi M, Yokoyama M, Horimoto E, Obara M, Iwai M, <u>Sato H</u> , Sata T, Takizawa T.	Low hemagglutinin-titer strains of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus circulated in Toyama Prefecture, Japan, during the 2009-2011 influenza seasons.	Jpn J Infect Dis.	64	448-50	2011

Ujike, M., Ejima, M., Anraku, A., Shimabukuro, K., Obuchi, M., Kishida, N., Hong, X., Takashita, E., Fujisaki, S., Yamashita, K., Horikawa, H., Kato, Y., Oguchi, A., Fujita, N., Tashiro, M., Odagiri, T. and the Influenza Virus Surveillance Group in Japan	Monitoring and characterization of Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009-1010.	<i>Emerg. Infect. Dis.</i>	17	470-479	2011
Sakai E, Yamamoto T, Yamamoto K, Mizoguchi Y, Kaneno H, Ihashi M, Takano M, Anzai K, Kase T, Shimotsuji T	A case study of IgG3 deficiency regarding the severity of Influenza H1N1 pdm 09.	<i>Pediatric International</i>	54 (6)	758-761	2012
Hamada N, Imamura Y, Hara K, Kashiwagi T, Imamura Y, Nakazono Y, Chijiwa K, Watanabe H.	Intrahost emergent dynamics of oseltamivir-resistant virus of pandemic influenza A(H1N1)2009 in a fatally immunocompromised patient	<i>Journal of Infection and Chemotherapy</i>	18	865-871	2012
S.Fujisaki, E.Takashita, M.Yokoyama, T.Taniwaki, H.Xu, N.Kishida, H.Sato, M.Tashiro, M.Imai and T.Odagiri.	A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs.	<i>Biochemical and biophysical research communications</i>	429	51-56	2012
E.Takashita, Y.Muraki, K.Sugawara, H.Asao, H.Nishimura, K.Suzuki, T.Tsuji, S.Hongo, Y.Ohara, Y.Kawaoka, M.Ozawa and Y.Matsuzaki.	Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein.	<i>Journal of Virology</i>	86	13108-13111	2012
喜屋武向子、平良勝也、岡野祥、仁平稔、糸数清正、久高潤、古謝由紀子、平良知、棚原憲実、石上五世、松野朝之、上原健司、国吉秀樹、田仲康雅、小林孝暢	2009/10シーズン夏季のインフルエンザウイルス検出状況—沖縄県	病原微生物検出情報	31(10)	297	2010
池田辰也、青木洋子、安孫子千恵子、水田克巳	山形県における新型インフルエンザウイルス(A/H1N1pdm) 検出状況	山形県衛生研究所報	43	21-23	2010