

原 著

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)

矢野拓弥, 原 有紀*, 植嶋一宗*, 中山 治*,
赤地重宏, 小林隆司, 西中隆道

**Virological Analysis on AH3 Subtype Influenza virus Detected from an Outbreak
in the Nursing Home in Influenza non-epidemic Season Mie prefecture (2014)**

Takuya YANO, Yuki HARA, Kazumune UESHIMA,
Osamu NAKAYAMA, Shigehiro AKACHI,
Takashi KOBAYASHI and Takamichi NISHINAKA

2014年8月に三重県内の高齢者福祉施設で呼吸器症状を呈する患者(28名)が発生した。これらの患者のうち3名の検査を実施したところ、患者2名からAH3亜型インフルエンザウイルス(AH3亜型ウイルス)が分離された。これらのAH3亜型ウイルスについてヘマグルチニン(Hemagglutinin: HA)遺伝子系統樹解析を実施した。本ウイルスは2014/15シーズンのワクチン株(A/H3N2; A/New York/39/2012)と同じVictoria/208クレードに属していたが、サブクレードはワクチン株とは異なる3C.2aに属していることが判明した。

また、赤血球凝集抑制(Hemagglutinationinhibition: HI)試験による抗原解析においてもワクチン株(A/H3N2; A/New York/39/2012)と比較して抗原性の乖離が認められた。抗原性の変化を早期に察知するためには、インフルエンザウイルスの非流行期を含めた通年における継続的な動向監視を行うことが重要である。また抗原性の変化を迅速に情報提供していくことは公衆衛生の向上に有用であり、感染拡大防止対策に寄与するものと考えられる。

キーワード: 高齢者福祉施設, AH3亜型インフルエンザウイルス, 遺伝子系統樹解析
非流行期, 集団感染

はじめに

インフルエンザウイルスは、特に高齢者において重症化しやすく、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¹⁻⁵⁾。

我が国におけるインフルエンザの流行は年により異なるが、これまでの感染症発生動向調査事業によると晩秋から初冬に患者が報告されはじめ、冬季(1~2月)に定点医療機関あたりの患者報告数が30人前後となりピークに達し、春先(3~4月)に終息となる流行パターンを示す^{6,7)}。一方、沖縄県^{8,9)}では近年、インフルエンザの非流行期である夏季に流行

が確認されており、国内における流行には地域差がみられる。そこで今回、本県の高齢者福祉施設内で2014年の夏季に発生した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(AH3亜型ウイルス)のウイルス学的解析について以下に報告する。

対象と方法

1. 高齢者福祉施設内集団感染事例の概要

高齢者福祉施設の入所者、通所者および職員の臨床・疫学情報は保健所職員の聞き取り調査

*三重県津保健所

および検査依頼施設記入の調査票の情報を基に集計を行った。

2. 対象者

2014年8月中旬に本県の高齢者福祉施設内で、A型インフルエンザウイルスによる集団感染事例が報告され、同ウイルスの亜型を究明するために症状を有する同施設の一部の入所者（2名）および職員（1名）の計3名から採取した臨床検体（咽頭拭い液）を、亜型同定試験および抗原解析等のウイルス学的検査に用いた。

3. インフルエンザウイルスの亜型同定試験

インフルエンザウイルスの亜型同定には、患者（3名）の臨床検体からRNAをQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出し、Conventional RT-PCR法およびReal-Time RT-PCR法による遺伝子検査¹⁰⁾にてインフルエンザウイルスの亜型同定試験を行った。

4. 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24ウエルの培養用プレートを用いてCO₂インキュベーター内(34℃)で3~4日間単層培養し、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¹⁰⁾。

5. 赤血球凝集抑制試験による抗原解析

分離されたインフルエンザウイルス株についての抗原性解析は、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より2014年に配布(ウサギ免疫血清)された抗A/California/7/2009 (A/H1N1pdm09)血清、抗A/New York/39/2012 (A/H3N2)血清、抗B/Massachusetts/02/2012 (山形系統)血清、抗B/Brisbane/60/2008 (Victoria系統)血清を使用し、0.75%モルモット血球を用いた赤血球凝集抑制(Hemagglutination inhibition: HI)試験により抗原性解析¹⁰⁾を行った。

6. 遺伝子系統樹解析

分離されたインフルエンザウイルス株について、ヘマグルチニン(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¹⁰⁾。

7. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験には、4種類のノイラミニダーゼ(NA)阻害薬(オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビル, ラニナミビル)に対する感受性試験を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において実施した。試験はNA-Fluor Influenza Neuraminidase Assay Kit (Applied Biosystems)を用いた蛍光法により行った。各々のNA阻害薬に対する解析株の感受性は、ウイルスのNA活性を50%阻害する薬剤濃度(IC₅₀)により比較した¹⁰⁾。

結果

1. 高齢者福祉施設内集団感染事例の概要

2014年8月に高齢者福祉施設(入所者97名, 通所者47名, 職員102名)において, 入所者14名および通所者8名の計22名, 職員6名の合計28名が発症した。8月14日に当該施設2階担当の職員(No1)が発熱および咳症状を呈したが, 翌15日まで勤務した。また, 15日には4階担当の職員(No2)が発症したが, 翌16日まで勤務した。さらに18日には職員1名(No3)および入所者4名(2階2名, 4階2名)が発熱等を呈し有症者となり, 翌19日に職員1名(No4)および入所者3名(2階2名, 4階1名)にも同様の症状が現れ, 当該施設の2階および4階の入所者を中心に感染拡大となった(Table1)。当該施設の感染拡大防止対策として, 抗インフルエンザ薬の予防および治療投与, 罹患者の隔離および未罹患者の移動制限が実施された。また入所および通所者等の受け入れ制限を行い, 面会者のマスク, 手指消毒の実施が義務付けられたことにより, 2014年8月27日以降, 新たな発症者は認められず, 同年9月1日に本事例は終息したものと判断された。

2. インフルエンザウイルスの亜型同定

患者(3名)から採取された咽頭拭い液を用いてConventional RT-PCR法およびReal-Time RT-PCR法にてインフルエンザウイルスの各亜型同定試験を実施したところ, 対象とした患者3名中2名からAH3亜型ウイルスが検出された。MDCK細胞によるウイルス分離においても, 2名から2代培養で細胞変性が認められ, 同様に同亜型インフルエンザウイルスが分離同定(A/Mie/27/2014株, A/Mie/30/2014株)された。

3. 赤血球凝集抑制試験による抗原解析

本事例のAH3亜型ウイルス(A/Mie/27/2014株, A/Mie/30/2014株)についてHI試験による抗原性解析を実施したところ, 抗A/New York/39/2012 (A/H3N2)血清(ホモ価2,560)に対してHI価320を示し, A/Mie/27/2014株およびA/Mie/30/2014株の

Table1. Symptomatic period of patients

Nursing home patient				Symptomatic period (August, 2014)													
Patient No	Age	Gender	Floor	8/14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Staff																	
1	53	F		[Symptomatic period bar]													
2	38	F		[Symptomatic period bar]													
3	47	M		[Symptomatic period bar]													
4	39	F		[Symptomatic period bar]													
5	31	M		[Symptomatic period bar]													
6	51	F		[Symptomatic period bar]													
Residen																	
7	84	M	2F	[Symptomatic period bar]													
8	80	M	2F	[Symptomatic period bar]													
9	82	M	4F	[Symptomatic period bar]													
10	93	F	4F	[Symptomatic period bar]													
11	80	F	2F	[Symptomatic period bar]													
12	83	M	4F	[Symptomatic period bar]													
13	75	M	2F	[Symptomatic period bar]													
14	82	F	3F	[Symptomatic period bar]													
15	83	M	3F	[Symptomatic period bar]													
16	93	F	2F	[Symptomatic period bar]													
17	66	M	4F	[Symptomatic period bar]													
18	85	F	4F	[Symptomatic period bar]													
19	85	F	4F	[Symptomatic period bar]													
20	84	F	4F	[Symptomatic period bar]													

[Symptomatic period bar] Symptomatic period (August,2014)

▲ Medication start date

抗原性は2014/15シーズンのワクチン株であるA/New York/39/2012 (A/H3N2) に対して8倍差異が認められた (Table 2) .

なお, 抗A/California/7/2009 (A/H1N1pdm09) 血清 (ホモ価1,280), 抗B/Massachusetts/02/2012 (山形系統) 血清 (同640), 抗B/Brisbane/60/2008 (Victoria系統) 血清 (同640) に対するHI価は10未満であった.

4. 遺伝子系統樹解析

本事例のAH3亜型ウイルス (A/Mie/27/2014株, A/Mie/30/2014株) についてHA遺伝子系統樹解析を実施したところ, 2株の分離株はアミノ酸置換 (S45N, T48I) を有するVictoria/208クレード内でアミノ酸置換 (Q33R, N278K) を有するサブクレード3Cに属していた.

今回, 分離されたAH3亜型ウイルスは, さらに, アミノ酸置換 (L3I, N144S, F159Y, K160T, N225D, Q311H, D489N) を持つサブクレード3C.2aの集団に属していた (Fig1) .

5. 薬剤感受性試験

本事例のAH3亜型ウイルス (A/Mie/30/2014株) を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へ送付し, NA阻害薬に対する感受性

試験を実施した. 4種類のNA阻害薬 (オセルタミビル, ペラミビル, ザナミビル, ラニナミビル) に対するIC₅₀値は各々0.18nM, 0.17nM, 0.27nM, 0.75nMで, 各々のNA阻害薬感受性参照株と比較して, 全てのNA阻害薬に対して感受性を保持していた.

考 察

国内の夏季の集団感染事例は少数であるものの報告^{11,12)} があり, 特に2005年頃より沖縄県では夏季における流行^{8,9)} が確認されている. また国内では流行期から外れた時季に外国渡航歴を有する患者からウイルスが検出¹³⁻¹⁷⁾ されることがあり, 本県においては2013年9月上旬にインドネシアから帰国後に発熱等を呈した患者からAH3亜型ウイルスが検出¹⁸⁾ された事例があることから, 非流行期における外国からの輸入ウイルスによる患者発生には注意が必要である. 近年, 流行しているAH3亜型ウイルスはHA遺伝子系統樹解析において, Victoria/208クレード3Cに属しており, このVictoria/208クレード3Cは, 3C.1~3C.3の3つのサブクレードに細分化され, さらに3C.2内には3C.2aが, 3C.3内には3C.3aが形成されている¹⁹⁾ . 本事例のAH3亜型ウイルス (A/Mie/27/2014株, A/Mie/30/2014株) はサブク

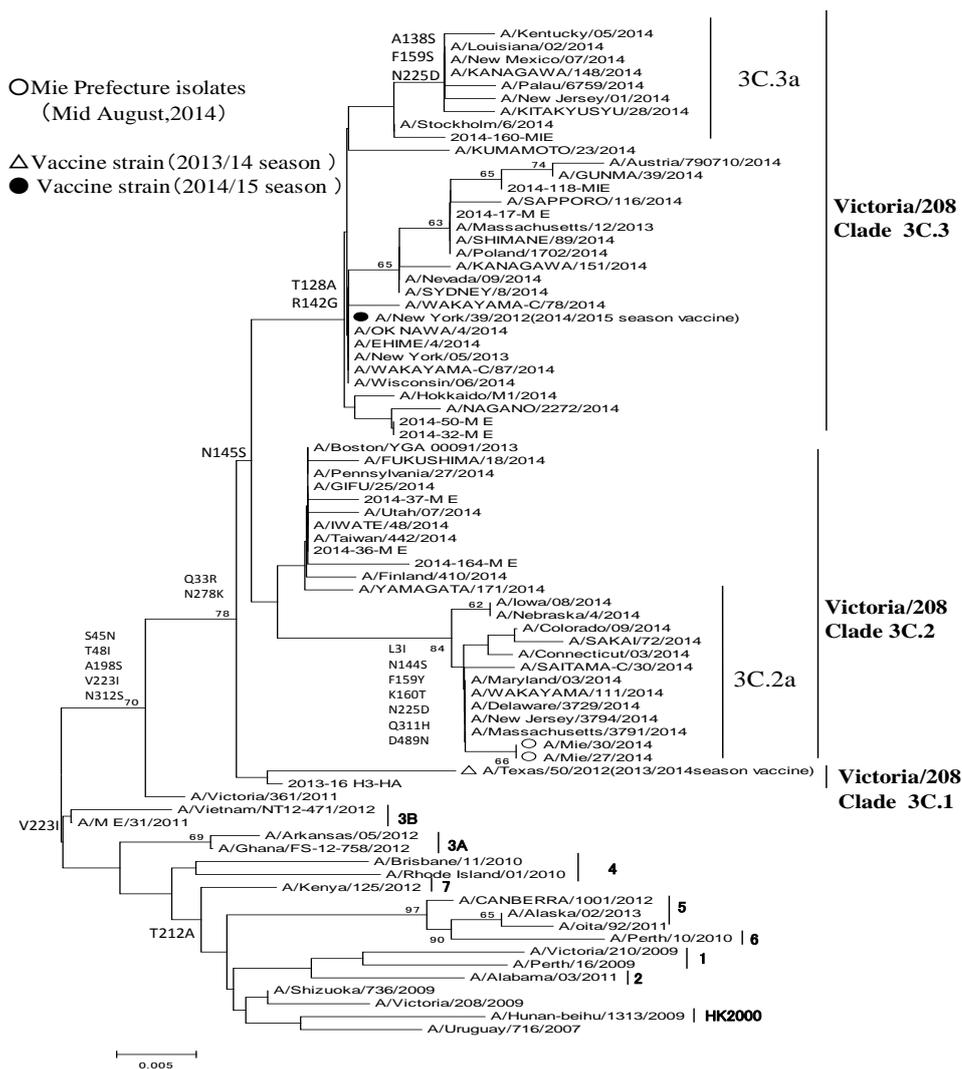


Fig1. Phylogenetic trees for the HA gene of A/H3N2 viruses.

リード3C.2a集団に属しており、これらの株は2014/15シーズンのワクチン株であるA/New York/39/2012 (A/H3N2) とは異なるサブクレードであった。またHI抗原解析においても同様にワクチン株との乖離が認められ、本事例は変異ウイルスによる施設内流行であったことが明らかとなった。このことから非流行期のウイルス抗原性の把握は今後のウイルス動向を知るうえで重要だと考えられる。

本事例は、当該施設の職員に感染し、その後、入所者への感染へと移行していたことから、インフルエンザに罹患した職員が介護等に従事する間に飛沫や接触感染により、職員間あるいは施設の入所者に拡散し集団感染となったことが推測された。最初の罹患者である職員が発症後

も介護業務に従事していたことが施設内流行に繋がった要因である。

2009年に発生した新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09) における我が国の重症例が少数であった理由として、患者の早期受診と抗インフルエンザ薬の適切な投与による早期治療開始によると考えられている²⁰⁾。本事例においてもAH3亜型ウイルス (A/Mie/30/2014株) はNA阻害薬に対し感受性株であったことから、その後の入所者および職員への早期の治療投薬および予防投与が有効となり、さらに隔離措置により小規模な施設内流行にとどまったものと思われる。本事例のような閉鎖された環境下での集団生活を営む施設では、飛沫や接触によるヒトからヒトへの伝播によって、一旦、施設内の感染者数

Table2. Antigenic analysis of the A/H3N2 isolates by the HI test

Viruses	Antisera			
	A/ California/7/2009 (A/H1N1 pdm09)	A/New York/39/2012 (A/H3N2)	B/ Massachusetts/02/2012 (Yamagata lineage)	B/ Brisbane/60/2008 (Victoria lineage)
Viruses strains				
A/ California/7/2009 (A/H1N1 pdm09)	1280	<10	<10	<10
A/New York/39/2012 (A/H3N2)	<10	2560	<10	<10
B/ Massachusetts/02/2012 (Yamagata lineage)	<10	<10	640	<10
B/ Brisbane/60/2008 (Victoria lineage)	<10	<10	<10	640
Isolates (August 2014)				
A/Mie/27/2014 (A/H3N2)	<10	320	<10	<10
A/Mie/30/2014 (A/H3N2)	<10	320	<10	<10

が増加し拡散すると、終息に時間を要することが想定される。従って感染拡大防止には、最初の感染者の早期発見および早期隔離等の対策が有効と考えられ、今回は、初動対応の重要性が明らかとなった事例であった。感染症法の改正により、2016年4月からの季節性インフルエンザサーベイランスは、非流行期を含む積極的なサーベイランス体制が全国規模で実施されることになる。本事例のように流行シーズン前に分離されたウイルスは、国内における次シーズンの流行株になりうることから、ウイルス株の収集および解析を実施することで、病原体の性状変化、薬剤耐性株の発生状況、ワクチン株選定のために評価等が行われる²¹⁾。今後、さらなるインフルエンザウイルスの動向把握が強化され、公衆衛生の向上に寄与するものと期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、検体採取を担当された医療機関の諸先生方および関係各位お礼申し上げます。

また薬剤感受性試験を実施してくださいました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の諸先生方に深謝致します。

文 献

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) Goodman RA, Orenstein WA, Munro TF, Sikes KS : Impact of influenza A in a nursing home. *JAMA*; **247**, 1451-1453. (1982) .
- 6) 過去 10 年間との比較グラフ (週報)
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/10/2096-weeklygraph/1644-01flu.html>
- 7) 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>
- 8) 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).
- 9) 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).
 - 10) 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.
 - 11) Yasushi Yonezawa, Yumiko Inoue, Yoshiteru Kitahori, Mamoru Nakano et al: An influenza outbreak occurred in summer, a non-epidemic season, in a hospital in the northern area of Nara Prefecture, Japan, in Summer 2005, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **59**, 244-245 (2006).
 - 12) 日比野亮信，近藤大貴，Clyde Dapat, 他：2012/13 シーズン夏季に長崎で採取された A/H3N2 インフルエンザウイルスのシーケンス解析結果の報告，病原微生物検出情報，**34**，339-342 (2013).
 - 13) 清水英明，奥山恵子，平位芳江，他：台湾への渡航者から分離されたインフルエンザウイルス—川崎市，病原微生物検出情報，**24**，258 (2003).
 - 14) 伊木繁雄，佐藤千秋，長野秀樹：上海への渡航者から分離されたインフルエンザウイルス—北海道，病原微生物検出情報，**24**，259 (2003).
 - 15) 平良勝也，糸数清正，中村正治，他：ミャンマーへの渡航者から分離されたインフルエンザウイルス—沖縄県，病原微生物検出情報，**24**，259-260 (2003).
 - 16) 水野泰孝，金川修造，川名明彦，他：中国青海省より帰国した邦人からインフルエンザウイルス AH3 型が検出された事例，病原微生物検出情報，**26**，243 (2005).
 - 17) 中川直子，伊藤正寛：タイより帰国した邦人からインフルエンザウイルス AH3 型が検出された2例—神戸市，病原微生物検出情報，**26**，303 (2005).
 - 18) 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).
 - 19) 中村一哉，藤崎誠一郎，白倉雅之 他：2013/14 シーズンのインフルエンザ分離株の解析，病原微生物検出情報，**35**，254-258 (2014).
 - 20) Sugaya N, Shinjoh M, Mitamura K et al: Very low pandemic influenza A (H1N1) 2009 mortality associated with early neuraminidase inhibitor treatment in Japan: Analysis of 1000 hospitalized children. *J Infect* **63**: 288-94 (2011).
 - 21) 調恒明：科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究 H26年度 総括・分担研究報告書，(2015) .

Virological Analysis on AH3 Subtype Influenza virus Detected from an Outbreak in the Nursing Home in Influenza Non-epidemic Season Mie prefecture (2014)

Takuya YANO, Yuki HARA, Kazumune UESHIMA, Osamu NAKAYAMA, Shigehiro AKACHI,
Takashi KOBAYASHI and Takamichi NISHINAKA

Keywords: nursing home, non-epidemic season, outbreak, AH3 subtype influenza virus, phylogenetic analysis of gene

Twenty-eight cases presenting with respiratory symptoms occurred in the nursing home in August, 2014. Among these cases, AH3 subtype influenza virus was isolated in two of three cases. Phylogenetic analysis on hemagglutinin gene for isolated AH3 type virus revealed that this isolated virus belonged to Victoria /208 clade same as that for vaccine strain (A/H3N2 ; A/New York/39/2012) in 2014/15 season but that the virus belonged to 3C.2a, the subclade different from that for the above vaccine strain. In addition, the antigen analysis according to hemagglutination inhibition test showed estrangement of antigenicity in comparison with the vaccine strain.

It is important to conduct continuous trend monitoring all year round including influenza non-epidemic season to perceive the change in antigenicity early. In addition, rapid provision of information on change in antigenicity may be useful for the improvement of public health and contribute to preventive measures against infection spread.