

長崎県におけるインフルエンザの疫学調査(2000年度)

原 健志・上田竜生・平野 学・野口英太郎・平山文俊

Epidemic of Influenza in Nagasaki Prefecture(2000)

Kenshi HARA, Tatu UEDA, Manabu HIRANO, Hidetaro NOGUCHI
and Fumitoshi HIRAYAMA

Key word: Influenza, Epidemic, RT-PCR, Nagasaki Prefecture

キーワード: インフルエンザ, 流行, RT-PCR, 長崎県

はじめに

近年、わが国におけるインフルエンザの流行は A 香港 (H3N2) 型ウイルスと、A ソ連 (H1N1) 型ウイルスの A 亜型に、B 型のインフルエンザウイルスが加わり、シーズン毎に主流の優劣はあるものの、これら 3 種が交互にあるいは混合しながら毎年流行を繰り返している。

今年度もこれまでと同様、厚生労働省の感染症流行予測事業におけるインフルエンザ流行予測調査に併せて、本県における流行状況を把握する目的で疫学調査を実施しているため、その状況を報告する。

調査方法

1. 流行予測感染源調査

散发事例については、インフルエンザ流行予測事業の一環として、2000 年 12 月～2001 年 3 月の調査期間において、長崎市内 2 定点の内科医療機関で採取されたインフルエンザ様疾患患者の咽頭ぬぐい液、及び感染症発生動向調査事業の一環として、県内の小児科医療機関 11 定点等から採取された咽頭ぬぐい液についてウイルス分離を実施した。

集団発生事例については、学校施設等における

インフルエンザが原因と疑われる集団発生事例のうち、県内各保健所管内の初発事例について、有症者のうがい水を採取してウイルス分離を実施した。

2. ウイルス分離の方法

(1) 細胞増殖用の 5% GIBUCO 培養液 (培養液に牛胎児血清を 5% に添加) に MDCK 細胞を浮遊させ、24 穴トレイに 1ml づつ分注し CO₂ 培養器で 2 日間培養して、分離用細胞の準備を行った。

(2) 検体の咽頭ぬぐい液を VOLTEX にて振とう混和し、3,000 rpm 20 分遠心後、上清をウイルス分離に使用。

(3) (1) で 2 日間培養した MDCK 細胞を PBS(-) で洗浄後、(2) で処理した検体の上清を 1 穴に 0.1 ml 接種し、30 分間室温に置く。

(4) 細胞維持用の GIBUCO 培養液 (培養液 25 ml に対し 1mg/ml トリプシン 0.1ml、10% アルブミン 0.25ml 添加) を 0.9ml 分注し、CO₂ 培養器で 7 日間培養しながら、毎日、細胞変性効果 (以下、「CPE」と略す) を顕微鏡で観察した。

(5) CPE が認められたら、インフルエンザウイルスを疑い、最適の条件時にハーベストし、HA

試験、HI 試験を行った。CPE が認められなかった検体については、さらに盲継代のため(1)~(5)の操作を行い、すべての検体についてウイルスの有無を確認するため HA 試験を行った。

3. 分離したウイルス株の同定

(1) HI 試験

国立感染症研究所 (以下「感染研」と略す) より分与された次の感染フェレット抗血清を用いて HI 試験を実施した。

(a) Aソ連(H1N1) (以下「Aソ連」と略す) 型

- ・ A/Moscow/13/98
- ・ A/Newcaledonia/20/99

(b) A香港(H3N2) (以下「A香港」と略す) 型

- ・ A/Panama/2007/99

(c) B型

- ・ B/Shangdong (山東) /07/97
- ・ B/Yamanashi (山梨) /166/98

(d) 0.5%モルモット血球

使用した赤血球はモルモット血球を用い、HI 試験には 0.5%モルモット血球を使用した。

(2) RT-PCR(以下「PCR」と略す)検査

PCR の方法及び使用したプライマーは、HA 遺伝子の検出については、高尾ら¹⁾の方法を用い、NS 遺伝子検出については、Claas ECJら²⁾の方法に準じて検査を行った。

調査結果及び考察

1. 散発事例について

表 1 に検査した検体数及びウイルス分離成績を示す。今シーズンにインフルエンザウイルスが最初に分離されたのは B 型ウイルスであり、2000 年 12 月 26 日に長崎市内の医療機関を受診した患者から分離された。

インフルエンザ様疾患及び脳炎・脳症の疑いで搬入された検体は、計 98 検体でそのうち Aソ連型 5 株、A香港型 14 株、B 型 28 株が分離された。

脳炎・脳症の疑いで搬入された 2 検体については、ウイルス分離と併行して PCR 検査も実施

したが、ウイルス及びウイルスの遺伝子も検出できなかった。

2. 集団発生事例について

表 2 に示すとおり、今シーズン県内で起きた集団発生数は例年に比べて少なく 2 件であった。発生施設は、西彼保健所管内の中学校で 10 人中 6 人の生徒のうがい水から、Aソ連型のウイルスが分離された。また、五島保健所管内の小学校では 9 人中 7 人の生徒のうがい水から、B 型のウイルスが分離された。患者数が少なかったのは、1993 年度以来のことである。その原因として①ワクチン接種率の向上や感染を繰り返すことによって、現在の流行ウイルスに対して免疫を獲得した。②比較的雨の日が多く乾燥する日が少なく人々の咽頭への悪影響が少なかった事などが考えられる。

図 1 に県内での散発事例及び集団発生事例によるウイルスの分離状況を示す。

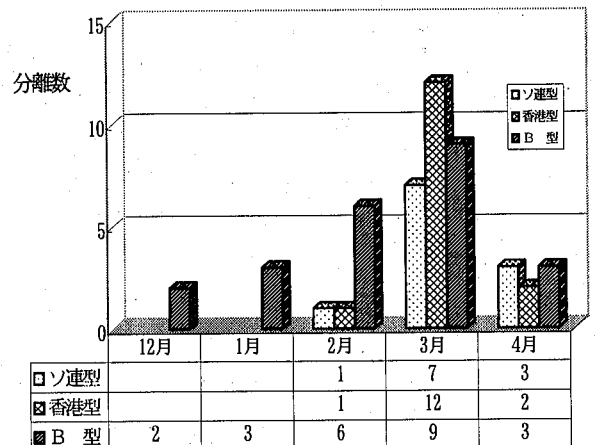


図 1 県内でのウイルスの分離状況

わが国における今シーズンのインフルエンザの流行は、①流行の始まりが昨シーズンより遅く、ウイルス分離のピークが 3 月に入ってからであったこと、②流行規模が過去に比べて小さかったこと等が特徴であった³⁾。ウイルス血清型別の分離比は、Aソ連型 38%、A香港型 16%、B 型 46%で 3 種類のウイルスの混合であった³⁾。本県での分離比は、Aソ連型 22%、A香港型 31%、B 型 47%で本県も 3 種類の血清型のインフルエ

ンザウイルスによる混合流行であった。

なお、今シーズン分離されたB型株は、感染研で実施した抗原解析の結果、分離株の大半がワクチン株のB/Yamanashi/166/98 とは抗原性が異なり、B/Sichuan(四川)/379/99 の類似株であり、これが流行の主流であったことが示された³⁾。当所でも、感染研から分与された抗血清を使用して HI 試験を行ったところ、今シーズン分離したB型の株は、B/Shangdong/07/97 には反応しなかったが、それ以外の抗血清に対して交差反応が見られ型別するのが困難であった。

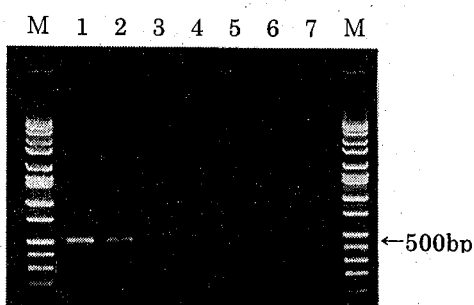


図2 (ソ連型プライマー : 512 b p)

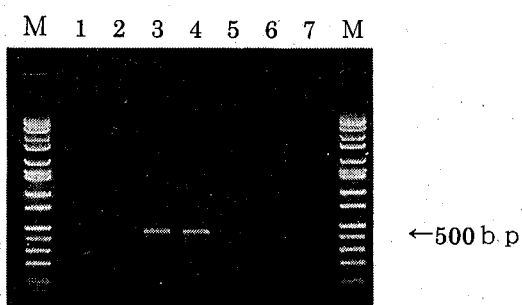


図3 (香港型プライマー : 456 b p)

M : マーカー 1~2 : Aソ連型 3~4 :
A香港型 5~6 : 分離株 7 : 蒸留水

そこで、HA 遺伝子と NS 遺伝子のプライマーを使用して PCR 検査で型別の確認を行った。図2~4に HA 遺伝子のプライマーを使用した PCR 検査結果を示す。図2、図3はA型の陽性対照としてレーン番号1~2にAソ連型の株、レーン番号3~4にA香港型の株、レーン番号5~6に型別困難な分離株(以下「分離株」と略す)、レーン番号7に陰性対照として蒸留水を置いた。

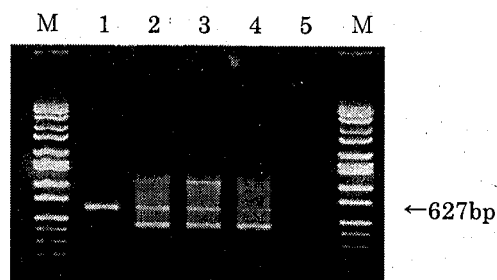


図4 (B型プライマー : 627 b p)

M : マーカー 1 : B型対照 2~4 :
分離株 5 : 蒸留水

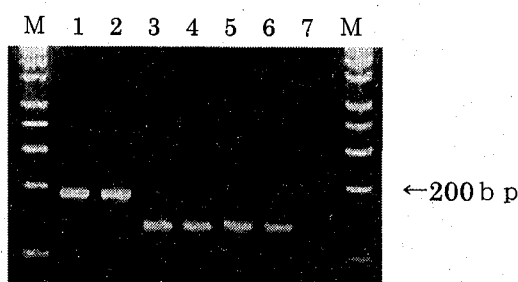


図5 (A型プライマー : 190 b p)

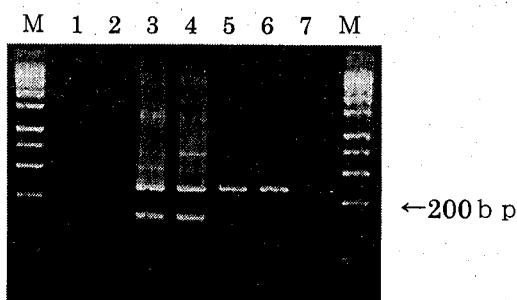


図6 (B型プライマー : 241 b p)

M : マーカー 1 : Aソ連型の株
2 : A香港型の株 3~6 : 分離株
7 : 蒸留水 (陰性対照)

図4は、レーン1にB型の陽性対照として県内で1999年に分離された株を使用し、レーン番号2~4に分離株を置いた。

その結果、ソ連型遺伝子検出用プライマーを使用した図2ではレーン番号1~2にAソ連型512bp、香港型遺伝子検出用プライマーを使用した図3ではレーン番号3~4にA香港型456bpの目的とする位置にバンドが認められたが、分離株であるレーン番号5~6ではバンドが認められなかった。

B型遺伝子検出用プライマーを使用した図4は、レーン番号2~4に置いた分離株もレーン番号1の陽性対照と同じ627bpの目的とする位置にバンドが認められ、分離株はB型と推定された。次に、図5にA型、図6にB型のNS遺伝子検出用プライマーを使用して行ったPCR検査結果を示す。

NS遺伝子は、インフルエンザウイルスRNAの8分節に位置し、変異が起きにくい遺伝子とされている²⁾。

A型の陽性対照として、レーン番号1にAソ連型の株、レーン番号2にA香港型の株、レーン番号3~6に分離株、レーン番号7に陰性対照として蒸留水を置いた。その結果、A型のNS遺伝子検出用プライマー使用では、図5に示すようにレーン番号1,2の陽性対照にA型の目的とする190bpの位置にバンドが認められたが、レーン番号3~6の分離株には、同じ位置にバンドが認められなかった。B型のNS遺伝子検出用プライマー使用では、図6に示すようにA型の陽性対照として置いたレーン番号1とレーン番号2にはバンドが認められなかったが、レーン番号3~6の分離株にはB型の目的とする241bpの位置にバンドが認められた。

以上のPCR検査結果から、HI試験で交差反応を起こし、型別するのが困難であった分離株は、インフルエンザB型ウイルスであると判定した。

まとめ

- 1.今シーズンは、インフルエンザ様疾患及び脳炎・脳症の疑いで搬入された検体は、98検体でそのうちAソ連型5株、A香港型14株、B型28株が分離された。集団発生は2施設で発生し、6名からA連型が、また、7名からB型が分離された。
- 2.本県における平成12年度のインフルエンザの流行は、ウイルスの分離比が、Aソ連型22%、A香港型31%、B型47%であり、Aソ連型、A香港型及びB型の3血清型のインフルエンザウイルスの混合流行であった。
- 3.今シーズン分離されたB型株は、大半がワクチン株であるB/Yamanashi/166/98と抗原性が異なり、HI試験で交差反応を起こし、型別するのが困難であった。その分離株について、HA遺伝子検出用プライマー及びNS遺伝子検出用プライマーを用いて、RT-PCR検査を行いインフルエンザB型ウイルスであることが判明した。

表1月別検体数及びウイルス分離状況

	12月	1月	2月	3月	4月	5月	合計
長崎市	10	12	5	4			31
	1	1	2	4			8
大村市	5	3	3	4	4		19
	1		1				2
島原市					6		6
					4		4
佐世保市	3	1	5	9	10	2	30
			4	5	4		13
福江市		2	2	8			12
		2	1	6			9
合計	18	18	15	25	20	2	98
	2	3	8	15	8	0	36

下段:ウイルス分離数

表2集団発生施設における調査成績

発生地	検体採取日	分離数/検体数	ウイルス型
高島町	2001/3/11	6/10	Aソ連型
福江市	2001/3/19	7/9	B型

参 考 文 献

- 1) 高尾信一、金本康生、妹尾正登、野田雅博、
徳本静代：混合プライマーを用いた PCR 法に
よるインフルエンザウイルスの検出と同定、
広島県保健環境センター研究報告、No.2 9
～13, (1994)
- 2) 山田 明 訳：PCR を用いた A 型、B 型、C
型インフルエンザウイルスの型の同定、ウイ
ルス感染症海外論文抄訳集、 134～135,
(1996.3)
- 3) 国立感染症研究所、厚生労働省健康局結核感
染症課：〈情報〉2000/01 シーズンインフル
エンザウイルス流行株の解析、病原微生物検出
情報、22(10), 12～19, (2001)