

広島市で検出されたインフルエンザウイルスの 抗原及び遺伝子解析 (2014/2015 シーズン)

山本 美和子 則常 浩太 加藤 寛子* 瀧口 由佳理*
藤井 慶樹 八島 加八 京塚 明美 石村 勝之

はじめに

インフルエンザは毎年冬期に流行を繰り返す。ヒトに対しては主に急な発熱や呼吸器症状を呈するが、肺炎や脳炎など重篤な合併症を引き起こすことがあり、特に小児や高齢者では死に至ることもある疾患である。

インフルエンザウイルスは変異しやすく、毎年流行ウイルスの抗原性が変わるため、ワクチン株の選定は、国内の流行状況、分離ウイルスの抗原性や遺伝子解析、抗体保有状況などの詳細な調査をし、さらに WHO の提唱した北半球次シーズンに対する推奨株の情報等の検討がなされ決定される¹⁾。そのため、流行株の詳細な解析が重要となる。

国内の分離株については、国立感染症研究所により、全国から集められたウイルス分離株のさまざまな解析が行われているが、今回、広島市においてウイルス分離できた株の抗原解析、遺伝子解析について行った結果をまとめたので報告する。

方 法

1 材料

2014 年 9 月から 2015 年 4 月までに、広島市感染症発生動向調査事業の病原体定点医療機関を受診し、発熱、呼吸器症状を呈した患者 638 人から採取した咽頭ぬぐい液、鼻汁、髄液を用いた。

2 ウイルス分離及び抗原解析

ウイルス分離には MDCK(イヌ腎臓由来上皮)細胞を使用した。3,000rpm, 15 分遠心した検体の上清を細胞に接種し、トリプシン加 MDCK 用培地を添加し、34℃5%炭酸ガス培養した。1 週間観察、1 代継代した後さらに 1 週間観察した。その間に細胞変性効果(CPE)がみられたものについて国立感染症研究所から配布された 2014/15 シーズンキット(ウサギ免疫血清)(A/California/7/2009(H1N1)pdm09, A/NewYork/39/2012(H3N2), B/Brisbane/60/2008(ビクトリア系統), B/Massachusetts/02/2012(山形系統))を「インフルエンザ診断マニュアル」により調製し、ホモ価を測定した後、赤血

球凝集抑制(HI)試験を行った。血球は 0.75%モルト血球を用いた。

3 遺伝子検出(型・亜型・系統)検査

国立感染症研究所の「インフルエンザ診断マニュアル(第3版)」に準じて遺伝子検出を行った。患者の咽頭拭い液、鼻汁及び髄液 140 μ l を用い、QIAamp Viral RNA mini Kit(QIAGEN 製)で RNA を抽出した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 及びオリゴdT プライマー(ライテクト/ロジーズジャパン製)を使用し cDNA を合成した。TaqMan Fast Advanced Master Mix(ライテクト/ロジーズジャパン製)を用いて Real-time PCR を行い、検出及び型・亜型・系統の別を行った。

4 HA 遺伝子解析

MDCK 細胞で培養されたインフルエンザウイルスの培養上清を上述の遺伝子検出(型・亜型・系統)検査と同様に RNA 抽出し、cDNA を合成した。「インフルエンザ診断マニュアル」に掲載されている Forward primer(F-primer): H3HA1-BEGIN, Reverse primer(R-primer): H3-1105-1125R を使用し PCR を行い、増幅産物を電気泳動した。特異バンド

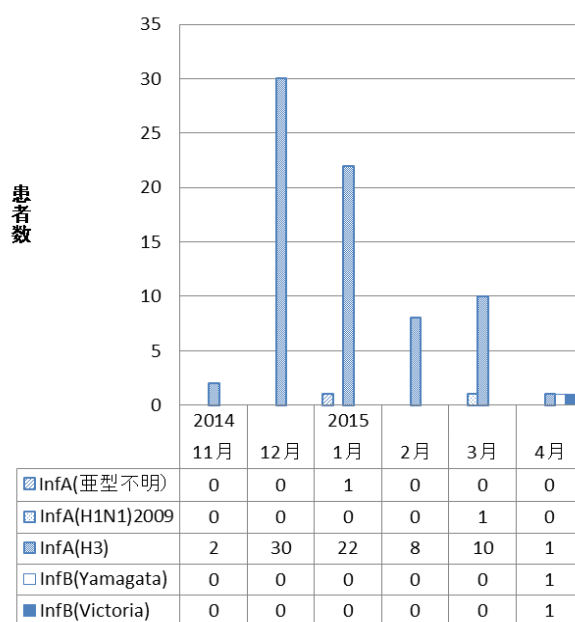


図1 月別検出状況

*: 現 衛生研究所環境科学部

表 分離株の HI 試験結果

採取日	株名	HI 試験 (ホモ価) A/NewYork /39/2012 (10240)	採取日	株名	HI 試験 (ホモ価) A/NewYork /39/2012 (10240)
2014/12/01	A/Hiroshima-C/31/2014	640	2014/12/15	A/Hiroshima-C/54/2014	320
2014/12/01	A/Hiroshima-C/32/2014	160	2015/01/08	A/Hiroshima-C/1/2015	1280
2014/12/13	A/Hiroshima-C/33/2014	320	2015/01/08	A/Hiroshima-C/2/2015	1280
2014/11/10	A/Hiroshima-C/34/2014	160	2015/01/08	A/Hiroshima-C/3/2015	320
2014/12/08	A/Hiroshima-C/35/2014	320	2015/01/08	A/Hiroshima-C/4/2015	320
2014/12/14	A/Hiroshima-C/36/2014	640	2015/01/09	A/Hiroshima-C/5/2015	320
2014/12/14	A/Hiroshima-C/37/2014	320	2015/01/06	A/Hiroshima-C/6/2015	5120
2014/12/15	A/Hiroshima-C/38/2014	160	2015/01/09	A/Hiroshima-C/7/2015	320
2014/12/14	A/Hiroshima-C/39/2014	320	2015/01/09	A/Hiroshima-C/8/2015	2560
2014/12/15	A/Hiroshima-C/40/2014	320	2015/01/14	A/Hiroshima-C/9/2015	1280
2014/12/16	A/Hiroshima-C/41/2014	640	2015/01/15	A/Hiroshima-C/10/2015	2560
2014/12/15	A/Hiroshima-C/42/2014	1280	2015/01/30	A/Hiroshima-C/11/2015	640
2014/12/22	A/Hiroshima-C/43/2014	1280	2015/01/30	A/Hiroshima-C/12/2015	640
2014/12/22	A/Hiroshima-C/44/2014	160	2015/01/30	A/Hiroshima-C/13/2015	320
2014/12/24	A/Hiroshima-C/45/2014	320	2015/02/03	A/Hiroshima-C/14/2015	320
2014/12/16	A/Hiroshima-C/46/2014	320	2015/01/27	A/Hiroshima-C/15/2015	320
2014/12/22	A/Hiroshima-C/47/2014	640	2015/02/05	A/Hiroshima-C/16/2015	1280
2014/12/22	A/Hiroshima-C/48/2014	640	2015/02/05	A/Hiroshima-C/17/2015	320
2014/12/22	A/Hiroshima-C/49/2014	320	2015/01/30	A/Hiroshima-C/18/2015	80
2014/12/24	A/Hiroshima-C/50/2014	320	2015/02/05	A/Hiroshima-C/19/2015	320
2014/12/24	A/Hiroshima-C/51/2014	320	2015/02/05	A/Hiroshima-C/20/2015	640
2014/12/24	A/Hiroshima-C/52/2014	320	2015/02/20	A/Hiroshima-C/21/2015	320
2014/12/24	A/Hiroshima-C/53/2014	640	2015/03/15	A/Hiroshima-C/22/2015	320

を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 製) でゲル精製を行った。BigDye XTerminator 精製キット (ライテクノロジー・システムズ製) で反応液を精製し、Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザで塩基配列を決定し、分子系統樹を作成した。

5 NA 遺伝子による薬剤耐性変異の検出

上述の HA 遺伝子解析の際に合成した cDNA を用い、1st PCR (F-primer: NA3-1, R-primer: NA-6) 及び Nested PCR (F-primer: NA3-3a, R-primer: NA3-8²⁾) を行い、増幅産物を電気泳動で確認後、塩基配列を決定した。アミノ酸配列へ変換し NA 遺伝子薬剤耐性マーカーである E119V の有無を確認した。

1 発生状況

638 人の検体を検査し、77 人からインフルエンザウイルスが検出された (図 1)。内訳は A(H1N1)2009 型が 1 人、AH3 型が 74 人、B 型が 2 人 (山形系統 1 人、Victoria 系統 1 人) であった。2014/2015 シーズンは AH3 型が主に流行した。

2 抗原解析 (表, 図 2)

国立感染症研究所から配布された 2014/2015 シーズンキットを使用した HI 試験の結果、A(H3N2) の抗血清 A/NewYork/39/2012 に対しての HI 価は、5120 が 1 株、2560 が 2 株、1280 が 6 株、640 が 9 株、320 が 23 株、160 が 4 株、80 が 1 株であった。しかし、国立感染症研究所によると³⁾、ここ数シーズンに分離される A(H3N2) ウイルスは、MDCK 細胞で分離すると NA 蛋白が、NA 活性に加え HA 活性

A (H3) 型分離株の A/NewYork/39/2012 株に対する HI 価							
80	160	320	640	1280	2560	5120	10240 (ホ 価)
1 株	4 株	23 株	9 株	6 株	2 株	1 株	0 株

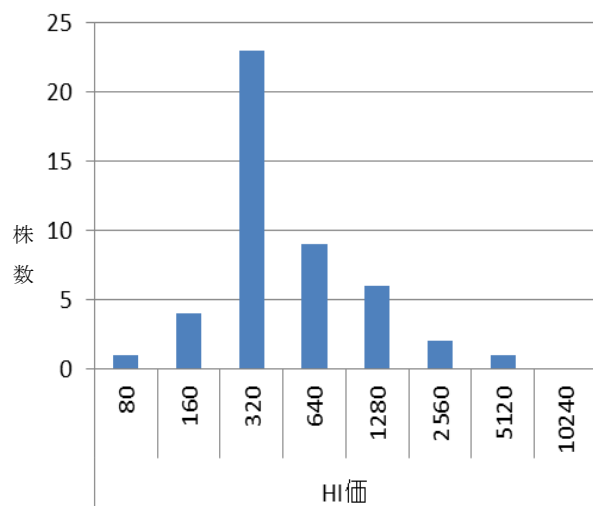


図 2 HI 試験による抗原解析結果

も発現し、正確な抗原性解析を困難にしているとのことであり、今回行った抗原解析の結果は正確ではない可能性がある。

3 HA 遺伝子解析

A (H3) 型は、2011/12 シーズン以降の分離株の一部と合わせ、69 株を解析した。624 塩基 (208 アミノ酸) の配列を決定し、系統樹を作成した (図 3)。2014/15 シーズンは 3C. 2 と 3C. 3 の 2 つのサブクレードに分かれた。主に、シーズン初期に分離された株は、3C. 3 に、シーズン中期～後期に分離された株は 3C. 2 に属した。

4 NA 遺伝子による薬剤耐性変異の検出 (図 4)

2014/15 シーズン分離株 19 株について、NA 遺伝子の塩基配列を決定し、アミノ酸に変換した後、薬剤耐性マーカーである E119V の有無について確認した。19 株すべてが E119V を保有していなかった。なお、NA 遺伝子の他の薬剤耐性マーカーである R292K 及び N294S について今回は確認していない。

考 察

2014/2015 シーズンは、主に AH3 型が流行し、シーズン後半では B 型が流行した。

HA 遺伝子解析では、今シーズンの分離株が 3C. 2 及び 3C. 3 という採取時期の違いにより 2 つのサブクレードに分かれていることが示された。全国的にも、解析した分離株のほぼ全てが、3C. 2a 及び 3C. 3a に属しており、同様の傾向を示した⁴⁾。今シーズンのワクチン株とは抗原性が少しずれていることも示唆された。

NA 遺伝子の薬剤耐性変異の解析では、国立感染症研究所の「インフルエンザ診断マニュアル (第 3 版)」に示されている 3 種類の薬剤耐性マーカーのうち 1 種類しか解析できなかったが、解析した 19 株すべて感受性であった。薬剤耐性株の解析は、治療薬を選択する際においても非常に重要であり、今後は 3 種類の薬剤耐性マーカーすべてにおいて解析したいと考えている。

謝 辞

広島市感染症発生動向調査事業にご協力頂いた定点医療機関各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立感染症研究所：平成 26 年度 (2014/15 シーズン) インフルエンザワクチン株の選定経過, IASR, 35, 267～269 (2014)
- 2) 長島真美 他：インフルエンザウイルスにおけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出 (2010-2011 シーズン), 東京都健康安全研究センター研究年報, 62, 57～63 (2011)
- 3) 小田切孝人：最近のインフルエンザ A (H3N2) 流行株の性状変化とその対策について, 希少感染症技術研修会, 2015 年 2 月 17 日
- 4) 国立感染症研究所, 厚生労働省結核感染症課：今冬のインフルエンザについて (2014/15 シーズン), <http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/2066-idsc/related/5647-fludoko-2014.html>

インフルエンザウイルスA(H3)型 HA遺伝子分子系統樹 (208アミノ酸)

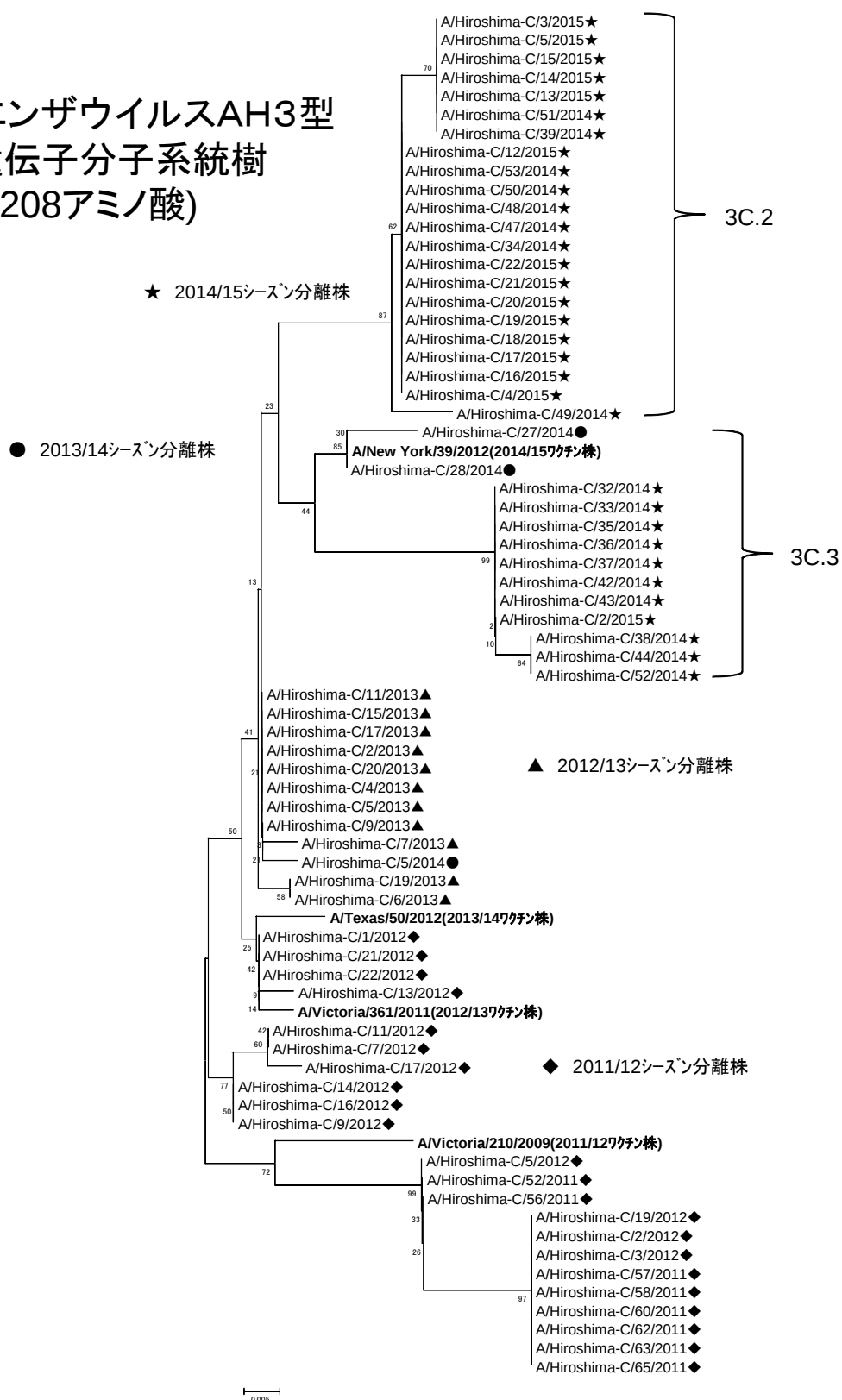


図3 インフルエンザウイルス A(H3) 型 HA 遺伝子領域の分子系統樹

耐性遺伝子
(E119V)

図4 NA 遺伝子による薬剤耐性マーカー (E119V) の検出