

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 (2015/16 シーズン)

山本 美和子 則常 浩太 藤井 慶樹 八島 加八
松室 信宏 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⁾。2015/16 シーズンは A/カリフォルニア/7/2009 (X-179A) (H1N1)pdm09, A/スイス/9715293/2013 (NIB-88) (H3N2), B/プーケット/3073/2013 (山形系統), B/テキサス/2/2013 (ビクトリア系統) がワクチン株として選定された²⁾。

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

2015 年 9 月から 2016 年 6 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 816 人から採取した咽頭拭い液、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た。トリプシン加 MDCK 用培地を添加し、34°C 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 2015/16 シーズンキット (A/カリフォルニア/07/2009 (H1N1)pdm09, A/スイス/9715293/2013 (H3N2), B/プーケット/3073/2013 (山形系統), B/テキサス/2/2013 (ビク

トリア系統)) 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 1% モルモット血球を用いた。

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 μl を用い、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 製) で RNA を抽出した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ライフテクノロジー ジャパン製) 及びオリゴ dT プライマー (ライフテクノロジー ジャパン製) を使用し cDNA を合成した。TaqMan Fast Advanced Master Mix (ライフテクノロジー ジャパン製) を用いて Real-time PCR を行い、検出及び型・亜型・系統の分類を行った。

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」に掲載されているプライマーのうち、A(H1N1)pdm09 型は、F-primer

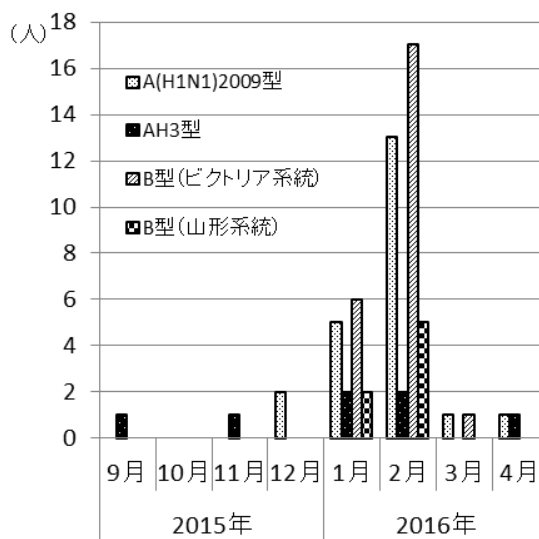


図 1 月別検出状況

表 1 分離株の HI 試験結果

採取週 (2016 年)	株名	HI 試験 (ホモ価)			
		A/カリフォルニア /7/2009 (2560)	A/スイス /9715293/2013 (1280)	B/フーケット /3073/2013 (80)	B/テキサス /2/2013 (1280)
4	B/Hiroshima-C/1/2016			<10	1280
4	B/Hiroshima-C/2/2016			640	<10
4	B/Hiroshima-C/3/2016			2560	<10
4	B/Hiroshima-C/4/2016			<10	1280
4	B/Hiroshima-C/5/2016			<10	320
5	B/Hiroshima-C/6/2016			<10	320
5	B/Hiroshima-C/7/2016			<10	320
5	A/Hiroshima-C/5/2016	320	<10		
5	A/Hiroshima-C/6/2016	320	<10		
5	A/Hiroshima-C/7/2016	320	<10		
5	B/Hiroshima-C/8/2016			<10	640
6	B/Hiroshima-C/9/2016			80	<10
6	B/Hiroshima-C/10/2016			<10	640
6	B/Hiroshima-C/11/2016			<10	1280
7	A/Hiroshima-C/1/2016	320	<10		
7	A/Hiroshima-C/3/2016	320	<10		
7	A/Hiroshima-C/8/2016	160	<10		
7	A/Hiroshima-C/9/2016	320	<10		
7	A/Hiroshima-C/2/2016	<10	80		
7	B/Hiroshima-C/12/2016			<10	640
7	B/Hiroshima-C/13/2016			<10	1280
7	B/Hiroshima-C/14/2016			<10	1280
7	B/Hiroshima-C/15/2016			<10	640
8	A/Hiroshima-C/4/2016	1280	<10		
8	B/Hiroshima-C/16/2016			80	<10
9	A/Hiroshima-C/10/2016	640	<10		
11	B/Hiroshima-C/17/2016			<10	640

:H1HA1-BEGIN, R-primer:swine H1-596-578R 及び F-primer:swine H1-277-296F, R-primer:swine H1-1106-1087R の 2 組, A(H3N2)型は, F-primer: H3HA1-BEGIN, R-primer:H3-1105-1125R, B 型は F-primer:BHA1-N, R-primer:BHA1-C を使用し, PCR を行い, 増幅産物を電気泳動した。特異バンドを切り出し, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 製) でゲル精製を行った。BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit(ライフテクノロジーズジャパン製) でサイクルシーケンシングを行い, その反応液を BigDye XTerminator 精製キット(ライフテクノロジーズジャパン製) で精製し, 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遺伝子 (H275Y) 解析

遺伝子検出(型・亜型・系統)検査の際に合成した cDNA を F-primer:swine N1-676-694F, R-primer:swine N1-1130-1111 を使用して PCR を行い, 増幅産物を電気泳動した。特異バンドを切り出し, HA 遺伝子解析と同様に塩基配列を決定した。アミノ酸へ変換し, 耐性マーカーである H275Y の有無を確認した。NA 遺伝子部分シーケンシング法で行ったため, C(275H) と T(275Y) の波形の重複が見られないか慎重に判定した。

結 果

1 発生状況(図 1)

816 人の検体を検査し, 60 人からインフルエンザウイルスが検出された。内訳は A(H1N1)pdm09 型が 22 人, A(H3)型が 7 人, B 型が 31 人(山形系統 7 人, ビクトリア系統 24 人)であった。

2 分離株の抗原解析(表 1, 2)

国立感染症研究所から配布された 2015/16 シーズンキットを使用した HI 試験の結果, A(H1N1)pdm09 型の抗血清 A/カリフォルニア/7/2009 に対しての HI 価(ホモ価 2560)は, 160 が 1 株, 320 が 6 株, 640 が 1 株, 1280 が 1 株であった。A(H3N2)型の抗血清 A/スイス/9715293/2013 に対しての HI 価(ホモ価 1280)は, 80 が 1 株であった。B 型(山形系統)の抗血清 B/プーケット/3073/2013 に対しての HI 価(ホモ価 80)は, 80 が 2 株, 640 が 1 株, 2560 が 1 株であった。B 型(ビクトリア系統)の抗血清 B/テキサス/2/2013 に対しての HI 価(ホモ価 1280)は 320 が 3 株, 640 が 5 株, 1280 が 5 株であった。

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)型ウイルスは, 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る。今回行った A(H3)型の抗原解析の結果もその影響を受けている可能性がある。

3 HA 遺伝子解析(図 2, 3, 4)

A(H1N1)pdm09 型は, 2009/10 シーズン以降の分離株の一部と合わせ 35 株解析した。A(H3)型は, 2011/12 シーズン以降の分離株の一部と合わせ, 89 株を解析した。B 型は 2011/12 シーズン以降の分離株の一部と合わせ 40 株を解析した。それぞれ

651 塩基(217 アミノ酸), 624 塩基(208 アミノ酸), 810 塩基(270 アミノ酸)の配列を決定し, 系統樹を作成した。

2015/16 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス A/Hiroshima-C/10/2016(A(H1N1)pdm09 型)とワクチン株である A/カリフォルニア/7/2009 との相同性は 96.2%(アミノ酸)であった。同シーズンに検出された 1160051N(AH3 型)とワクチン株である A/スイス/9715293/2013 との相同性は 96.7%(アミノ酸), 1160051N(AH3 型)と 2016/17 シーズンのワクチン株である A/香港/4801/2014²⁾ との相同性は 98.5%(アミノ酸)であった。B/Hiroshima-C/16/2016(B 型(山形系統))とワクチン株である B/プーケット/3073/2013(山形系統)との相同性は 99.2%, B/Hiroshima-C/15/2016(B 型(ビクトリア系統))とワクチン株である B/テキサス/2/2013(ビクトリア系統)との相同性は 99.7%(アミノ酸)であった。

4 NA 遺伝子による薬剤耐性遺伝子(H275Y)解析

2015/16 シーズンの分離株(A(H1N1)pdm09 型)9 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。薬剤耐性マーカーである H275Y は 9 株すべて保有していなかった。

考 察

2015/16 シーズンは, A(H1N1)pdm09 型及び B 型(ビクトリア系統)が流行した。

A(H1N1)pdm09 型は, ワクチン株のホモ価が 2560 であるのに対し, 分離株 9 株のうち 6 株が 320 であったこと, また HA 遺伝子解析において, 2015/16 シーズン分離株 A/Hiroshima-C/10/2016 とワクチン株との相同性が 96.2%であったことなどから,

表 2 分離株の抗原性

ウイルス抗原 (ホモ価)	抗原性の相違										小計
	(分離ウイルスを抗原とした HI 価										
	/ワクチン製造用株を抗原とした HI 価 : 2 ⁿ)										
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	
A/カリフォルニア/07/2009 (H1N12009) (2560)	1	6	1	1							9
A/スイス/9715293/2013 (H3N2) (1280)	1										1
B/プーケット/3073/2013 (山形系統) (80)					2			1		1	4
B/テキサス/2/2013 (ビクトリア系統) (1280)			3	5	5						13

2015/16 シーズンの分離株とワクチン株との抗原性が若干ずれている可能性が示唆された。

NA 遺伝子による薬剤耐性遺伝子(H275Y)解析の結果、広島市においては薬剤耐性マーカーである 275Y は検出されなかったものの、全国のデータ⁴⁾では、2016 年 6 月 27 日現在で 2,383 株解析したうちの 45 株(1.9%)が耐性株であり、次シーズンに薬剤耐性株が増加する可能性があることが示唆された。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、今後は他の薬剤耐性マーカーも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 27 年度(2015/16 シーズン)インフルエンザワクチン株の選定経過, IASR, 36, 217~220(2015)
- 2) 国立感染症研究所：2016/17 シーズンインフルエンザワクチン株 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/flutoppage/2066-idsc/related/584-atpcs002.html>
- 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：抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 2016 年 7 月 13 日 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/influ-resist/6586-flu-r20160708.html>

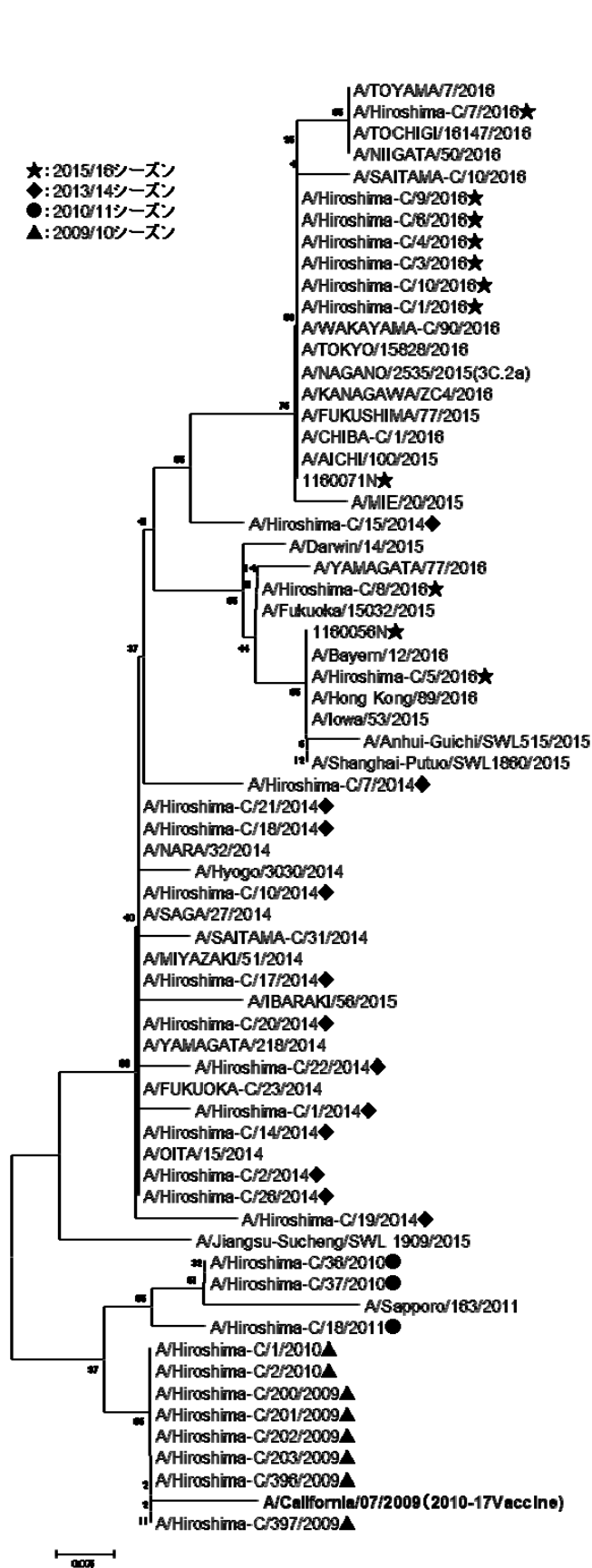


図2 A(H1N1)pdm09型HA遺伝子分子系統樹

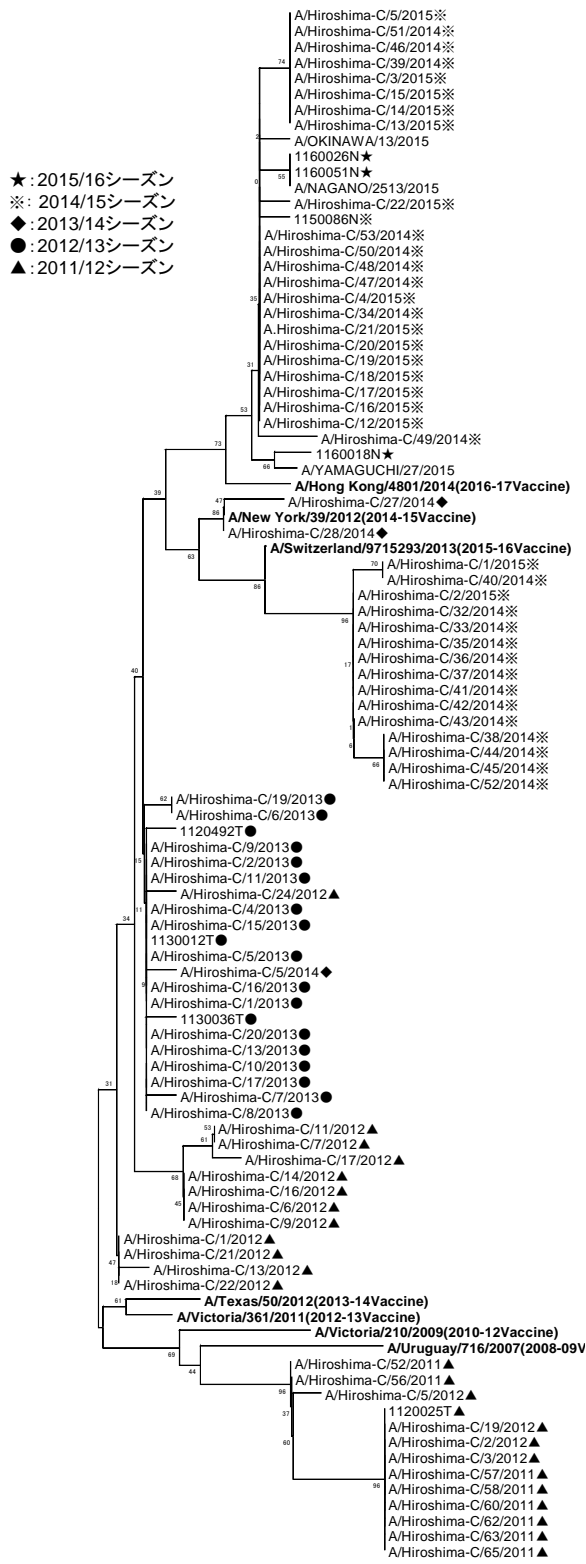


図3 A(H3)型HA遺伝子分子系統樹

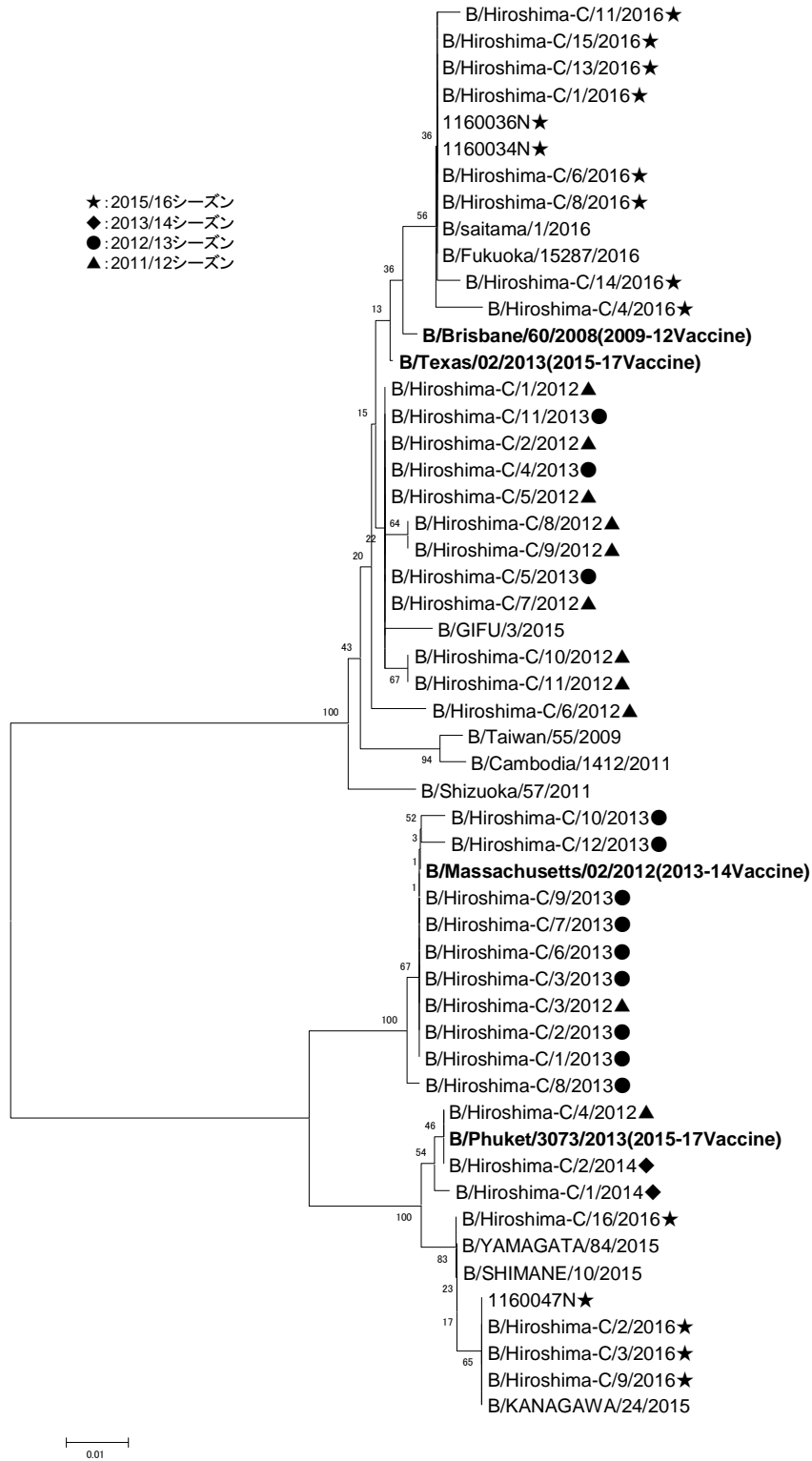


図4 B型HA遺伝子分子系統樹