

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 (2016/17 シーズン)

山本 美和子 則常 浩太 兼重 泰弘 藤井 慶樹
八島 加八* 松室 信宏

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⁾。2016/17 シーズンは A/カリフォルニア/7/2009 (X-179A) (H1N1)pdm09, A/香港/4801/2014 (X-263) (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 (平成 28 年 6 月 7 日厚生労働省健康福祉局長通知健発 0607 第 18 号)。

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様々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

2016 年 9 月から 2017 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 515 人から採取した 714 検体を用いた。

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 2016/17 シーズンキ

ット (A/カリフォルニア/07/2009 (H1N1)pdm09, A/香港/4801/2014 (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 0.75% 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。QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 製) を用い検体から 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 亜型は、F-primer: 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) 亜型は、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

表 1 NA 阻害薬耐性変異 (NA 蛋白質アミノ酸変異)

N1 NA	N2 NA	B NA
H275Y	E119V	R150K
D199N	R292K	D197E
I223R	N294S	D197N
N295S		I221T
		N294S
		G407S

*: 現 環境局環境保全課

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マーカー解析

遺伝子検出(型・亜型・系統)検査の際に合成した cDNA を A(H1N1)pdm09 型は、F-primer:swine N1-676-694F, R-primer:swine N1-1130-1111, A(H3N2) 型、F-primer:NA3-1, R-primer:NA3-6²⁾, B 型は F-primer:BNA-F355, R-primer:R1498-1472 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(表 1)の有無を確認した。

結 果

1 発生状況(図 1)

515 人の検体を検査し、35 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 亜型が 1 人、A(H3N2) 亜型が 30 人、B 型が 4 人(ビクトリア系統 2 人、山形系統 2 人)であった。

2 分離株の抗原解析(表 2)

国立感染症研究所から配布された 2016/17 シーズンキットを使用した HI 試験の結果を表 2 に示した。A(H1N1)pdm09 亜型の抗血清 A/カリフォルニア

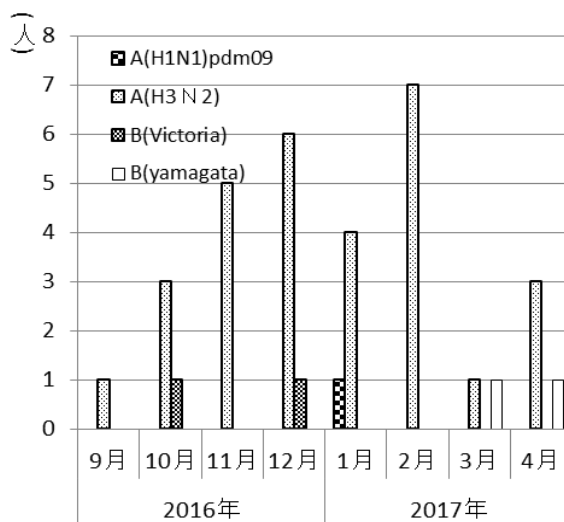


図 1 月別ウイルス亜型・系統別患者数

/7/2009 に対しての HI 価(ホモ価 640)は、640 が 1 株であった。A(H3N2) 亜型の抗血清 A/香港/4801/2014 に対しての HI 価(ホモ価 5120)は、80 が 2 株、160 が 3 株、320 が 1 株、1280 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 320)は 320 が 1 株であった。

国立感染症研究所によると²⁾、ここ数年シーズンに分離される A(H3N2) 亜型ウイルスは、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(H3N2) 亜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

2013/14 シーズンから 2015/16 シーズンまでの

表 2 2016/17 シーズン広島市分離株の HI 試験結果

採取週(年)	株名	HI 試験(ホモ価)			
		A/カリフォルニア /7/2009 (640)	A/香港 /4801/2014 (5120)	B/ブーケット /3073/2013 (640)	B/テキサス /2/2013 (320)
42(2016)	B/Hiroshima-C/18/2016			<10	320
44(2016)	A/Hiroshima-C/11/2016	<10	80		
46(2016)	A/Hiroshima-C/13/2016	<10	80		
46(2016)	A/Hiroshima-C/12/2016	<10	160		
47(2016)	A/Hiroshima-C/15/2016	<10	160		
47(2016)	A/Hiroshima-C/14/2016	<10	160		
3(2017)	A/Hiroshima-C/1/2017	640	<10		
7(2017)	A/Hiroshima-C/2/2017	<10	320	<10	<10
8(2017)	A/Hiroshima-C/3/2017	<10	1280	<10	<10

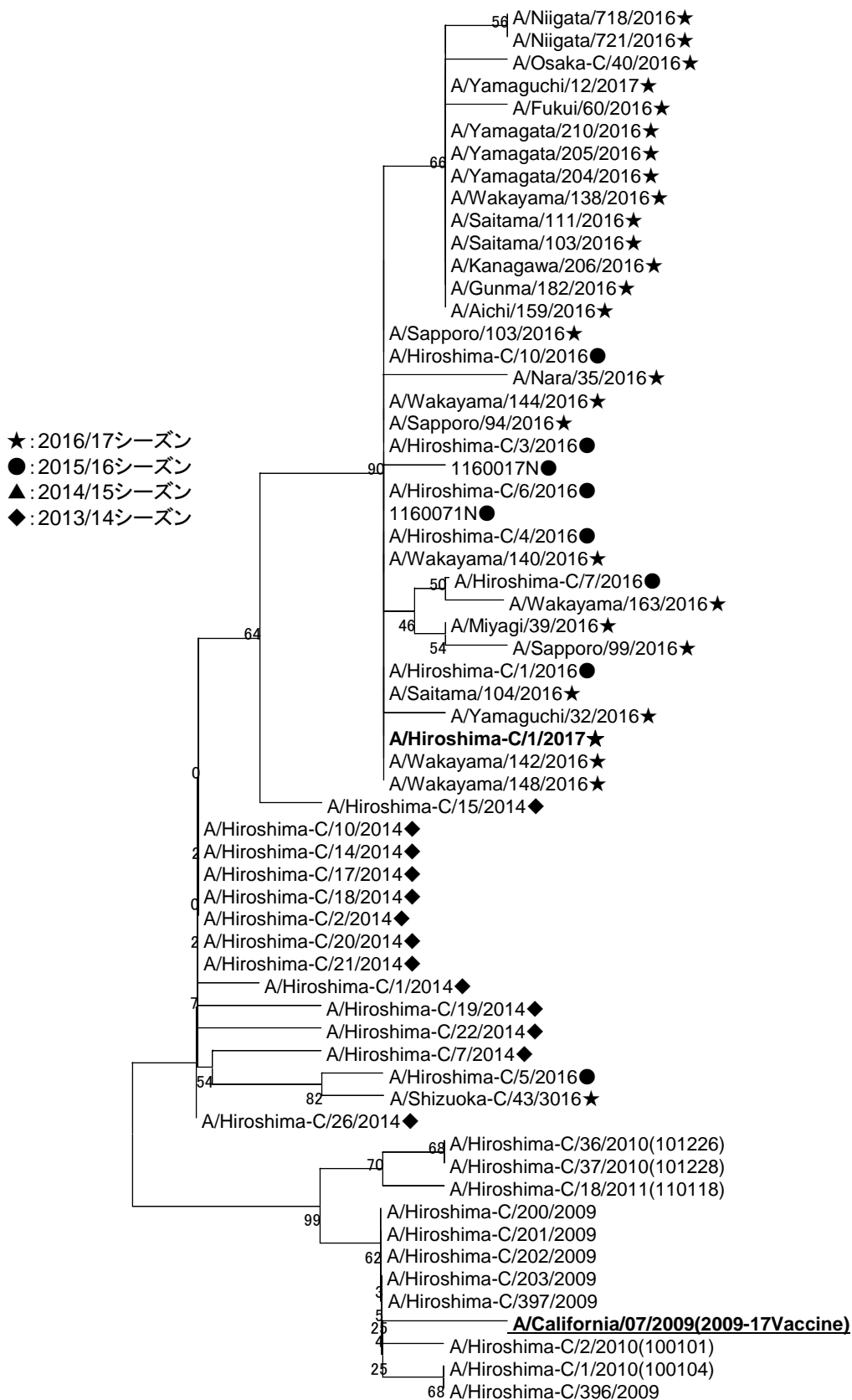


図2 A(H1N1)pdm09 亜型 HA 遺伝子分子系統樹

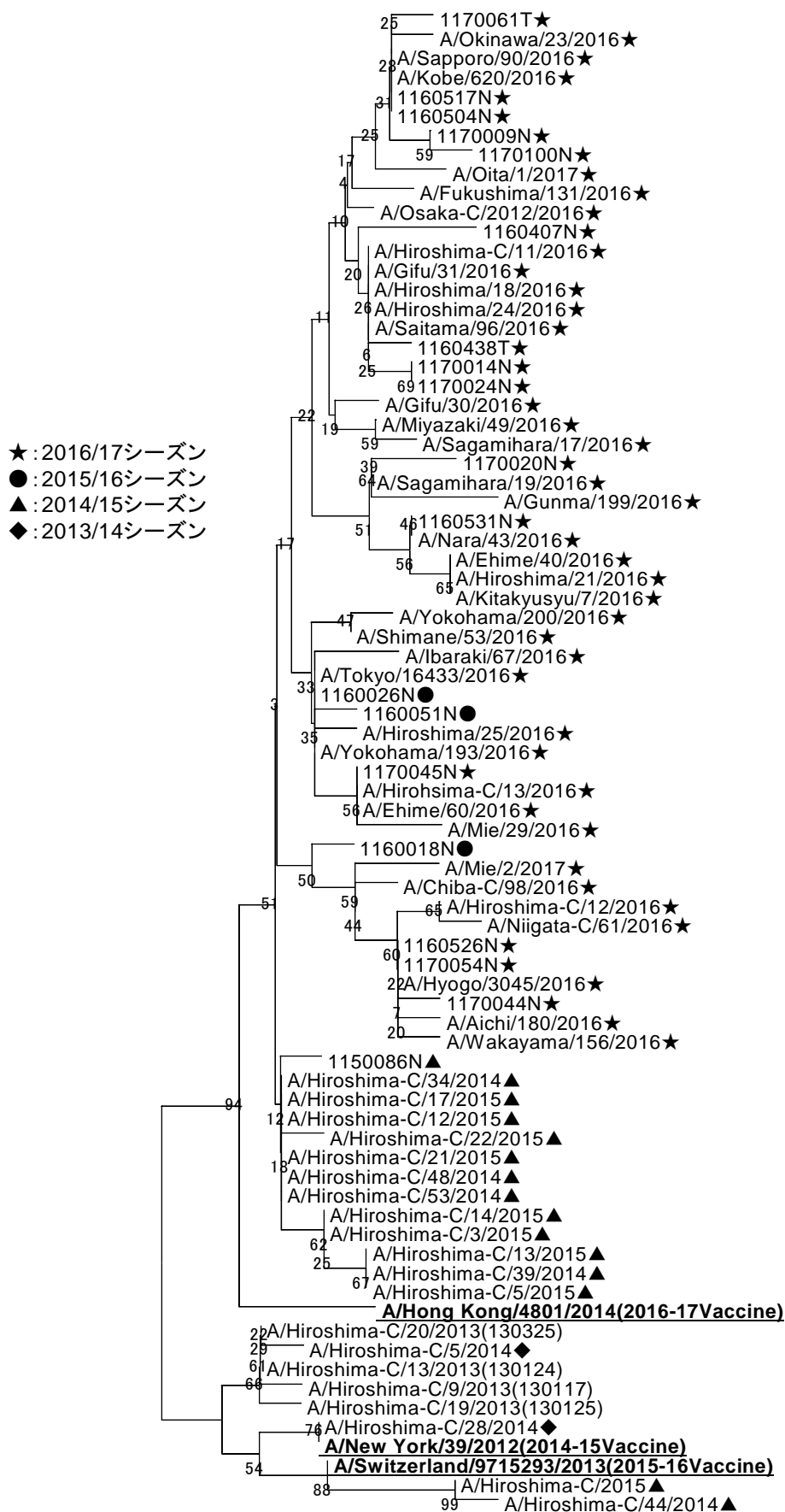


図3 A(H3N2)亜型 HA 遺伝子分子系統樹

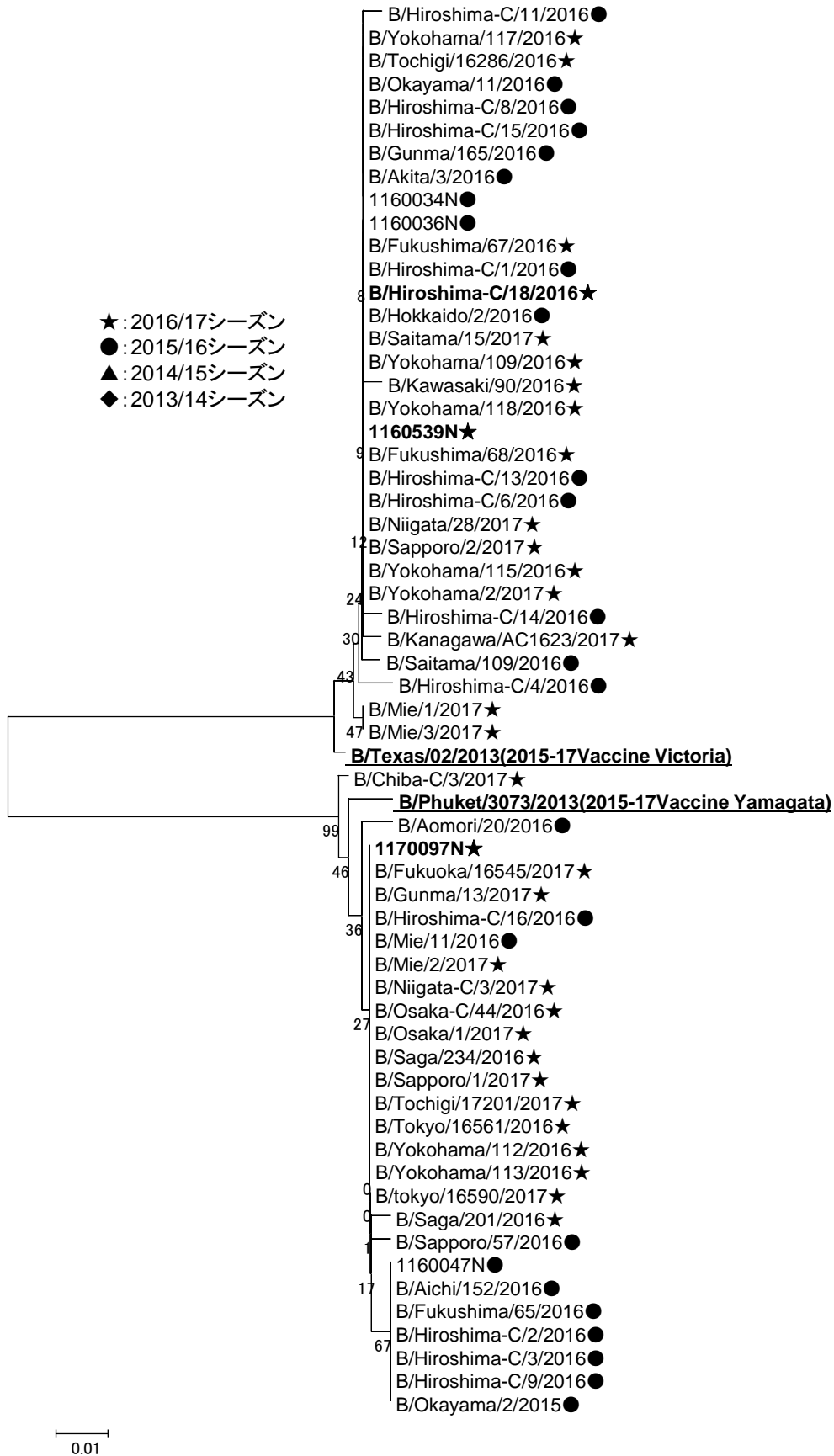


図4 B型 HA 遺伝子分子系統樹

表3 NA蛋白質アミノ酸変異(下線:既知の薬剤耐性アミノ酸部位)

N1 NA		<u>199</u>	<u>223</u>	241	264	270	<u>275</u>	<u>295</u>
ISIRV 耐性参照株	A/Perth/261/2009	D	I	V	V	N	Y	N
ISIRV 感受性参照株	A/Perth/265/2009	H	.
広島市分離株	A/Hiroshima-C/1/2017	—	—	I	I	K	H	.
N2 NA		<u>119</u>	147	194	245	267	<u>292</u>	<u>294</u>
ISIRV 耐性参照株	A/Fukui/45/2004	V	D	V	S	T	R	N
ISIRV 感受性参照株	A/Fukui/20/2004	E
広島市分離株	1160407N	E	N	I	N	R	.	.
	1160420T	E	N	I	N	K	.	.
	1160438T	E	N	I	N	K	.	.
	1160479N	E	N	I	N	K	.	.
	1160504N	E	N	I	N	K	.	.
	1160517N	E	N	I	N	K	.	.
	1160526N	E	N	I	N	K	.	.
	1160531N	E	N	I	N	K	.	.
	1170009N	E	N	I	N	K	.	.
	1170014N	E	N	I	N	K	.	.
	1170020N	E	N	I	N	K	.	.
	1170024N	E	N	I	N	K	.	.
	1170044N	E	N	I	N	K	.	.
	1170045N	E	N	I	N	K	.	.
	1170061T	E	N	I	N	K	.	.
	1170064N	E	N	I	N	K	.	.
	1170100N	E	N	I	N	K	.	.
	2165602T	E	N	I	N	K	.	.
	A/Hiroshima-C/12/2016	E	N	I	N	K	.	.
	A/Hiroshima-C/13/2016	E	N	I	N	K	.	.
	A/Hiroshima-C/14/2016	E	N	I	N	K	.	.
	A/Hiroshima-C/2/2017	E	N	I	N	K	.	.
	A/Hiroshima-C/3/2017	E	N	I	N	K	.	.
B NA		<u>150</u>	<u>197</u>	198	<u>221</u>	<u>294</u>	320	<u>407</u>
ISIRV 耐性参照株	B/Perth/211/2001	R	E	N	I	N	E	G
ISIRV 感受性参照株	B/Perth/211/2001	.	D
広島市分離株	1170097N	.	D	S	.	.	K	.
	B/Hiroshima-C/18/2016	.	D	.	.	.	D	.

分離株と合わせ, A(H1N1)pdm09 亜型は, 945 塩基 (315 アミノ酸), A(H3N2) 亜型は 834 塩基 (278 アミノ酸), B 型は 810 塩基 (270 アミノ酸) の配列を決定し, 系統樹を作成した (図 2~4)。

2016/17 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス A/Hiroshima-C/1/2017(A(H1N1)pdm09 亜型) とワクチン株である A/カリフォルニア

/7/2009 とのアミノ酸の相同性は 96.0%, 1170100N(A(H3N2) 亜型) とワクチン株である A/香港/4801/2014 とのアミノ酸の相同性は 96.9%, B/Hiroshima-C/18/2016(B 型(ビクトリア系統)) とワクチン株である B/テキサス/02/2013(ビクトリア系統) とのアミノ酸の相同性は 98.9%, 1170097N(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)とのアミノ酸の相同性は99.5%であった。

4 NA 遺伝子による薬剤耐性マーカー解析

2016/17 シーズンの分離株 A(H1N1)pdm09 亜型 1 株, A(H3N2)亜型 23 株, B 型 2 株について, NA 遺伝子の塩基配列を決定後, アミノ酸に変換し, 薬剤耐性マーカーの有無を確認した(表 3)。A/Hiroshima-C/1/2017(A(H1N1)pdm09 亜型)については, D199N, I223R の有無の確認ができなかったが, それ以外の全ての株については薬剤耐性マーカーを保有していないことが確認できた。

考 察

2016/17 シーズンは, A(H3N2)亜型が流行した。分離株の HI 試験結果(表 2)では, A(H3N2)亜型はホモ価が 5120 であるのに対し, 80 が 2 株, 160 が 3 株, 320 が 1 株と 7 株中 6 株において 8 倍以上抗原性が低下している結果となった。A(H3N2)亜型ウイルスは, 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²⁾といわれている。今回の結果では, 今シーズンの流行株は抗原性が変異している結果となったが, 上記のような理由もあり HI 試験のみでの正確な判断は難しい。2016/17 シーズン及び 2015/16 シーズンのワクチン株と広島市分離株における HA アミノ酸の相

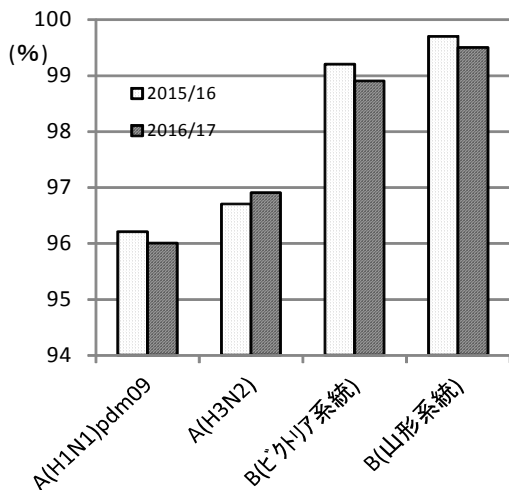


図 5 ワクチン株と分離株の HA アミノ酸の相同性

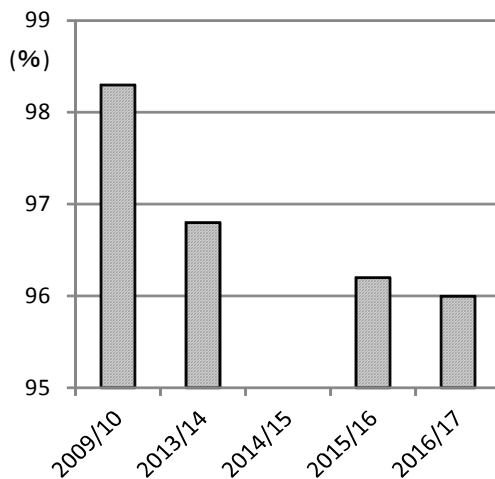


図 6 ワクチン株と分離株の HA アミノ酸の相同性(A(H1N1)pdm09 亜型)

同性を図 5 に示した。B 型はいずれのシーズンも, ビクトリア系統, 山形系統ともに高い結果となり, A 型は A(H1N1)pdm09 亜型, A(H3N2)亜型のいずれも, B 型と比較すると若干低い結果となった。さらに A(H1N1)pdm09 亜型について 2009/10 シーズンから 2016/17 シーズンまでのワクチン株と広島市分離株との HA アミノ酸の相同性を図 6 に示した。2014/15 シーズンは分離株がないため比較できないが, 年々ワクチン株との相同性が低くなっており, 抗原性が徐々に低下している可能性が示唆された。

NA 遺伝子による薬剤耐性マーカー解析の結果(表 3), 今シーズンの全ての分離株において薬剤耐性マーカーは確認されなかった。しかし, 薬剤耐性株は, 検出され始めると急激に増加し, 1 シーズンでほとんどが耐性株に変化してしまう可能性もあるので, 今後も継続して解析していく必要がある。

文 献

- 1) 国立感染症研究所:平成 28 年度(2016/17 シーズン)インフルエンザワクチン株の選定経過, IASR, 37, 225~227(2016)
- 2) 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