

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(2017/18 シーズン)

則常 浩太 福永 愛 兼重 泰弘 藤井 慶樹
山本 美和子 松室 信宏 坂本 綾

はじめに

インフルエンザは毎年冬季に流行し、発熱、頭痛、全身倦怠感、筋肉痛・関節痛などを引き起こす。高齢者や免疫機能が低下している者は症状が重篤化し、時に死に至る場合もある。

インフルエンザウイルスのワクチン株選定は、国内ウイルス株の抗原分析及び遺伝子解析の結果、並びに世界保健機関におけるワクチン推奨株検討会議の議論、さらには、ワクチン接種後のヒト血清抗体の反応性の評価を踏まえて決定される¹⁾。2017/18 シーズンは A/シンガポール/GP1908/2015(IVR-180A)(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29年7月12日厚生労働省健康福祉局長通知健発0712第2号)。

また、国内の分離株は、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及び遺伝子解析を行い結果をまとめたので報告する。

方法

1 材料

2017年9月から2018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86人から採取した95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°C5%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2017/18シーズンキット(A/シンガポール/GP1908/2015(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ズジャパン製)及びオリゴ dT プライマー(ライフテクノロジーズジャパン製)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。A(H1N1)pdm09 亜型については、SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNAPolymerase(ライフテクノロジーズジャパン製)を用いた One-Step RT-PCR により、目的遺伝子を増幅した。PCR に用いたプライマーは「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, swine H1-277-296F, swine H1-366-385F 及び R-primer: swine H1-596-578R, H1-1106-1087R を組み合わせて使用した。A(H3)亜型は、F-primer: H3HA1-BEGIN, R-primer: H3-1105-1125R, B型は F-primer: BHA1-N, R-primer: BHA1-C を使用した。PCR 後、増幅産物を電気泳動し、非特異的増幅産物が確認された場合、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。非特異的増幅産物が確認されなかった場合は、ExoSAP-IT ExpressPCR Cleanup Reagents (ThermoFisher SCIENTIFIC)を用い、PCR 産物の精製を行った。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, アミノ酸へ変換後, 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 を用いて, A(H1N1)pdm09 型の F-primer: swine N1-676-694F, R-primer: swine N1-1130-1111R を使用して PCR を行い, 増幅産物を電気泳動した。HA 遺伝子解析と同様に塩基配列を決定し, アミノ酸へ変換後, 275 番目のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに変異した, 薬剤耐性マーカーである H275Y を確認した。

結 果

1 発生状況(図 1)

86 人の検体を検査し, 34 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 15 人, A(H3)亜型が 7 人, B 型(山形系統)が 12 人であった。

2 分離株の抗原解析(表 1)

国立感染症研究所から配布された 2017/18 シーズンキットを使用した HI 試験の結果を表 1 に示した。A(H1N1)pdm09 亜型の抗血清 A/シンガポール/GP1908/2015 に対しての HI 価(ホモ価 1280)は, 10240 が 8 株, 5120 が 4 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 640 が 2 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

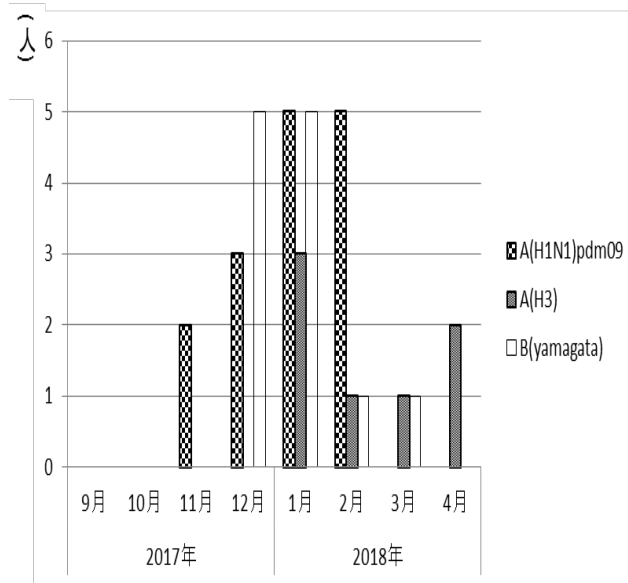


図 1 月別ウイルス亜型・系統別患者数

価(ホモ価 160)は 640 が 1 株, 320 が 1 株, 160 が 3 株, 80 が 6 株であった。

3 HA 遺伝子解析(図 2, 図 3, 図 4)

2014/15 シーズンから 2016/17 シーズンまでの分離株及び臨床検体から検出された株と合わせ, A(H1N1)pdm09 亜型は, 993 塩基(331 アミノ酸), A(H3)亜型は 858 塩基(286 アミノ酸), B 型は 756 塩基(252 アミノ酸)の配列を決定し, 系統樹を作成した(図 2~4)。

2017/18 シーズンに分離されたインフルエンザウイルス A/Hiroshima-C/3/2018(A(H1N1)pdm09 亜型)とワクチン株である A/シンガポール/GP1908/2015 とのアミノ酸の相同性は 97.9%, A/Hiroshima-C/9/2018(A(H3)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 97.1%, B/Hiroshima-C/2/2017(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 98.8%であった。

4 A(H1N1)pdm09 薬剤耐性遺伝子解析

2017/18 シーズンの分離株 A(H1N1)pdm09 亜型 13 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, 薬剤耐性マーカーである H275Y を確認した。その結果, A/Hiroshima-C/2/2018 は, H275Y 耐性変異が, A/Hiroshima-C/4/2018 は 275H/Y mix が確認された。国立感染症研究所で薬剤感受性試験を行ったところ(表 2), 2 株のうち, A/Hiroshima-C/2/2018 はオセルタミビル及びペラミビルに対して耐性を示し, A/Hiroshima-C/4/2018 はオセルタミビルに耐性を示し, ペラミビルに対しては感受性低下と判定された。また, ザナミビル及びラニナミビルに対してはどちらの株も感受性を保持していた。

考 察

2017/18 シーズンは流行開始時, AH1pdm09 亜型と B 型が増加し, 年明け頃より A(H3N2)亜型が流行する混合流行となった。このことが, 今シーズンのインフルエンザ患者数増加の要因となったことが示唆されている²⁾。

分離株の HI 試験結果(表 1)では, A(H3N2)亜型のホモ価 5120 に対して, 分離株 2 株とも HI 価が 640 であり, 抗原性変異の目安となる 8 倍の低下を認めた。しかし, A(H3N2)亜型ウイルスは MDCK 細胞で分離すると, NA に特異的な変異が誘導され, NA が赤血球凝集活性を示すようになり, HI 試験による詳細な抗原性解析を困難にするといわれてい

表1 分離株のHI試験結果

採取週 (年)	株名	HI試験(ホモ価)			
		A/シンガポール /GP1908/2015 (1280)	A/香港 /4801/2014 (5120)	B/ブーケット /3073/2013 (160)	B/テキサス /2/2013 (320)
48(2017)	A/Hiroshima-C/5/2017	10240	<10		
48(2017)	A/Hiroshima-C/6/2017	5120	<10		
49(2017)	B/Hiroshima-C/1/2017			80	<10
49(2017)	B/Hiroshima-C/2/2017			160	<10
49(2017)	A/Hiroshima-C/7/2017	5120	<10		
50(2017)	A/Hiroshima-C/8/2017	5120	<10		
50(2017)	B/Hiroshima-C/3/2017			80	<10
51(2017)	B/Hiroshima-C/4/2017			80	<10
51(2017)	B/Hiroshima-C/5/2017			80	<10
1(2018)	B/Hiroshima-C/1/2018			80	<10
1(2018)	A/Hiroshima-C/1/2018	10240	<10		
3(2018)	A/Hiroshima-C/3/2018	10240	<10		
4(2018)	A/Hiroshima-C/2/2018	10240	<10		
4(2018)	B/Hiroshima-C/2/2018			160	<10
4(2018)	B/Hiroshima-C/3/2018			160	<10
4(2018)	B/Hiroshima-C/5/2018			320	<10
4(2018)	A/Hiroshima-C/10/2018	5120	<10		
5(2018)	B/Hiroshima-C/4/2018			80	<10
6(2018)	A/Hiroshima-C/4/2018	10240	<10		
6(2018)	A/Hiroshima-C/5/2018	10240	<10		
7(2018)	A/Hiroshima-C/6/2018	10240	<10		
7(2018)	A/Hiroshima-C/7/2018	10240	<10		
10(2018)	B/Hiroshima-C/6/2018			640	<10
14(2018)	A/Hiroshima-C/8/2018	<10	640		
15(2018)	A/Hiroshima-C/9/2018	<10	640		

る²⁾。そのため抗原性が変異しているかどうかの正確な判断はHI試験では難しい。A(H1N1)pdm09 亜型とB型インフルエンザウイルス(山形系統)では、HI価が8倍以上低下している株はなく、抗原性は2017/18シーズンワクチン株と類似していた。

2017/18シーズンに当市で分離されたインフルエンザウイルス分離株とワクチン株とのHAアミノ酸の相同性を比較した。A(H1N1)pdm09 亜型はワクチン株と当市分離株とのHAアミノ酸の相同性が2009/10シーズンから2016/17シーズンまで年々下がっていた³⁾。今シーズンはワクチン株が前シーズンより変更になっており、その相同性は上がっていた。A(H3N2)亜型とB型インフルエンザウイルス(山形系統)は、前シーズンよりワクチン株の変更はなかったが、A(H3)亜型はアミノ酸の相

同性は上がっており、B型インフルエンザウイルス(山形系統)は下がっていた。なお、来シーズンより、A(H3N2)亜型とB型インフルエンザウイルス(ビクトリア系統)のワクチン株が変更となっており、分離株との抗原性がどのように変化するか調査していきたい。

NA遺伝子による薬剤耐性遺伝子(H275Y)解析(表2)では、当市分離株2株において薬剤耐性マーカーが確認された。国内においては、薬剤耐性株の流行は確認されていないが、散発的に検出されている状況にある⁴⁾。今後も薬剤耐性株の動向には注意を払う必要がある。

謝 辞

広島市感染症発生動向調査事業にご協力頂いた定

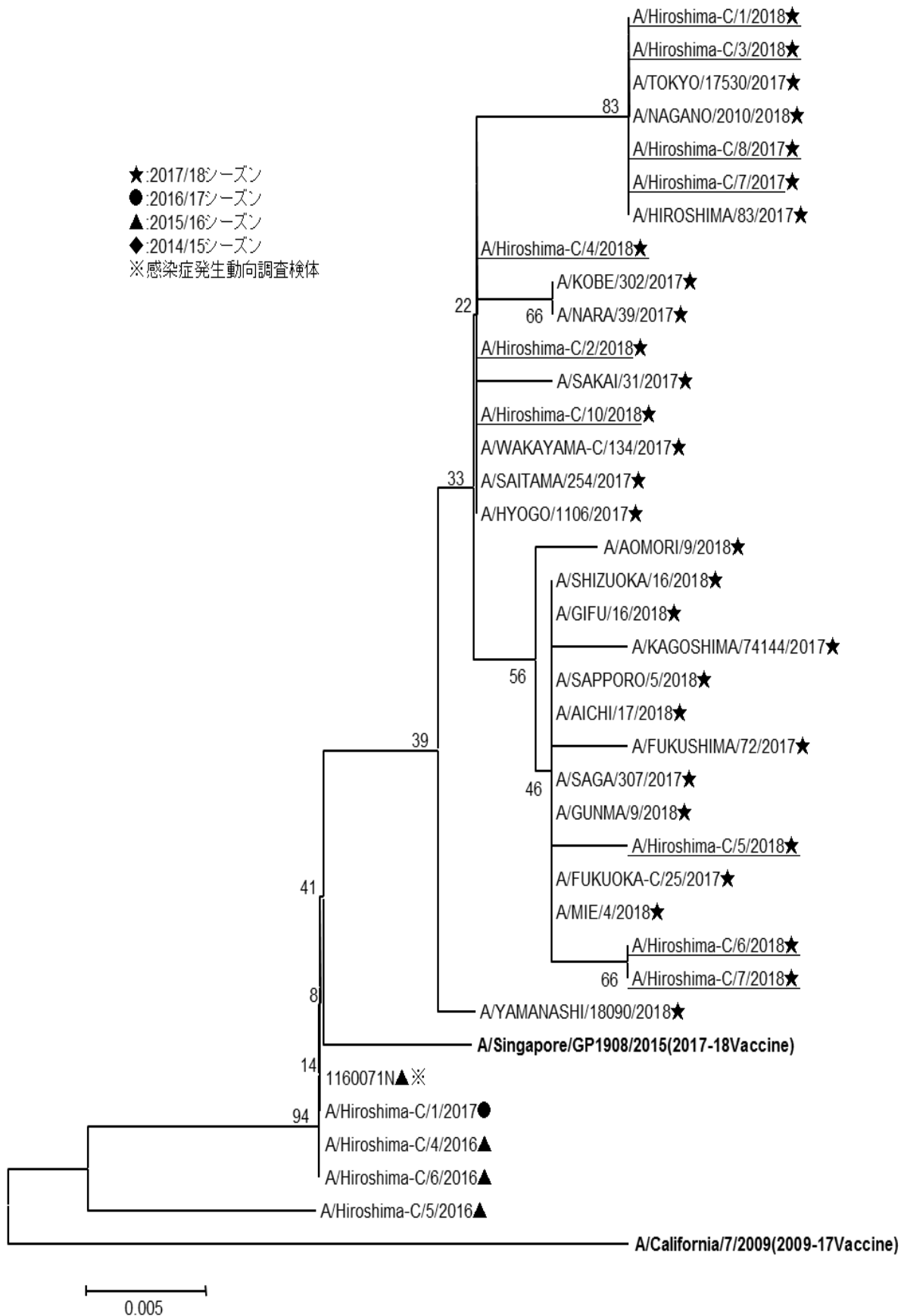


図 2 A (H1N1) pdm09 亜型 HA 遺伝子分子系統樹

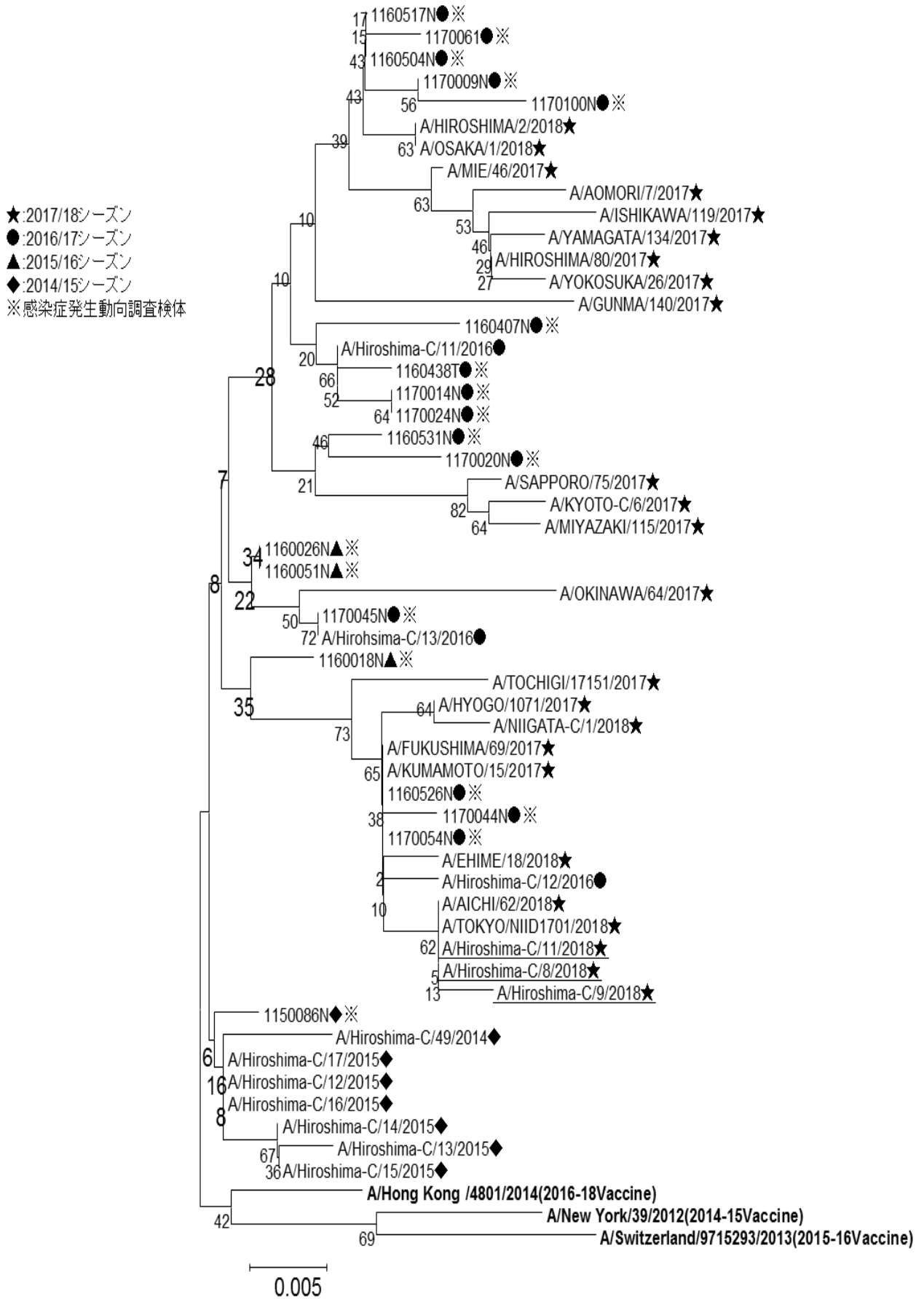


図3 A(H3)型HA遺伝子分子系統樹

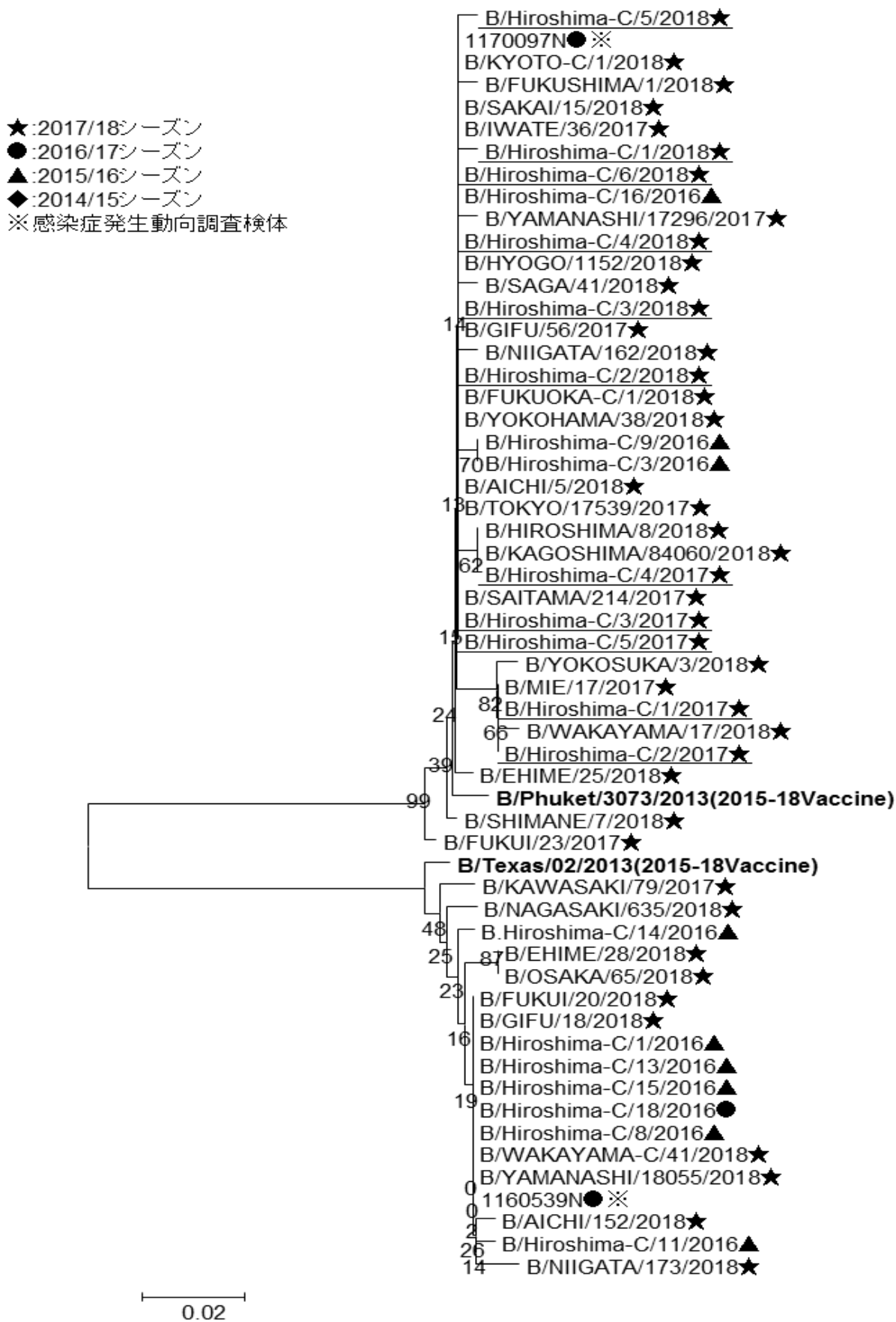


図4 B型HA遺伝子分子系統樹

表 2 抗インフルエンザ薬耐性株薬剤感受性試験結果

ウイルス株名	IC ₅₀ (nM)			
	オセルタミビル	ペラミビル	ザナミビル	ラニナミビル
A/Hiroshima-C/2/2018	463.42	27.04	0.33	0.78
A/Hiroshima-C/4/2018	104.78	5.17	0.19	0.59

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 29 年度(2017/18 シーズン)インフルエンザワクチン株の選定経過, IASR, 38, 225~226(2017)
- 2) 国立感染症研究所：今冬のインフルエンザについて(2017/18 シーズン)2018 年 6 月 15 日, <https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/disease/influ/fludocol1718.pdf>
- 3) 山本美和子 他：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), 広島市衛生研究所年報, 36, 93~99(2017)
- 4) 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第一室 他：抗インフルエンザ薬耐性株 2018 年 7 月 24 日, <https://www.niid.go.jp/niid/images/flu/resistance/20180727/dr17-18j20180727-1.pdf>