

短報

神奈川県域におけるインフルエンザウイルスA(H1N1)pdm09の遺伝子解析

渡邊寿美, 近藤真規子, 黒木俊郎

Genetic analysis of influenza virus A(H1N1)pdm09 in Kanagawa Prefecture

Sumi WATANABE, Makiko KONDO and
Toshiro KUROKI

はじめに

インフルエンザウイルスは、少しずつ遺伝子変異を繰り返しながら、毎年のように流行する。ヒトにおいてはA (H1N1) 型, A (H3N2) 型の2種類のA型とB型が単独で、あるいは混合で流行している。しかし、A型は前年までとは全く違う遺伝子配列を持ったウイルスが出現し、世界的大流行(パンデミック)を起こすことがあり、最近では2009年にブタ由来のA (H1N1) 型ウイルスpandemic A (H1N1) 2009 (以下, AH1pdm09) が世界中で大流行した。AH1pdm09ウイルスは、前年までにヒトで流行していたA (H1N1) 型(通称Aソ連型)と同じH1N1で表現されるが、遺伝的に異なる系統のウイルスである¹⁾。

近年では、抗インフルエンザ薬が開発されて早期治療が可能になり、また、ワクチン接種や抗菌剤で細菌の2次感染を防ぐなど様々な対策により、重症化率は著しく改善している。しかし、2007/2008シーズンには、抗インフルエンザ薬の一つであるリン酸オセルタミビル耐性ウイルスの流行が確認されている。また、過去のパンデミックを参考にすると、1918年にパンデミックを起こしたA (H1N1) 型(いわゆる「スペインかぜ」)の場合は、第2波の流行時には罹患者数は第1波よりも少なかったにもかかわらず、死亡率が高くなっている²⁾。そのため、AH1pdm09ウイルスについても監視する必要があり、病原性への関与が報告されている遺伝子変異について調査を行った。

材料および方法

パンデミックが発生した2008/2009シーズン以降の6シーズンに神奈川県(横浜市, 川崎市, 相模原市および横須賀市を除く神奈川県内, 以下, 県域)で分離されたAH1pdm09株のうち、入院例29例(死亡3例, 脳症12例, 肺炎14例)を重症例として選択し、インフルエンザウイルスの8分節遺伝子のうち病原性に関係することが分かっている4つの遺伝子(PB1, PB2, HA, NS1)を対象として遺伝子解析を行った。調査対象とした各遺伝子のAH1pdm09初期分離株における特徴¹⁾と調査項目は表1のとおりである。また、流行ウイルスの進化の傾向を知るため、感染症発生動向調査病原体定点の検体から分離された株を軽症例として各シーズン10株程度を選択し、HAの遺伝子解析を行った。シーズン毎の調査数は表2のとおりである。

ウイルス分離は、インフルエンザ診断マニュアル(第2版)³⁾に準拠し、MDCK細胞を用いて行った。分離株からQIAamp Viral RNA Mini Kit(キアゲン)を用いてRNAを抽出した。抽出RNAからA型共通プライマー(SZA+)⁴⁾およびSuper Script II RT(ライフテクノロジー)を用いて逆転写反応を行い、cDNAを作製した。PB1, PB2およびNS遺伝子のRT-PCR用およびシーケンス用プライマーは、ワクチン株であるA/California/7/2009の遺伝子配列を参考にして作製し、HA遺伝子のRT-PCR用およびシーケンス用プライマーはインフルエンザ診断マニュアル(第2版)³⁾に従った(表3)。TaqポリメラーゼはTaKaRa EX Taq Hot Start Version(タカラバイオ)を使用した。PCR産物について、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(ライフテクノロジー)を用いてダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、PB1, PB2, HA, NSの病原性に関与する遺伝子変異の有無を確認した。また、HAについてはNeighbor-Joining (NJ)法を用いて進化系統樹を作成し、流行株の特徴を解析した。

結果および考察

重症例の病原性に関与する遺伝子の解析結果を表4に示した。比較対象として、ワクチン株のA/California/7/2009と県域の初期軽症例であるA/Kanagawa/137/2009を用いた。PB1はRNA合成に関与する蛋白で、ヒトのAH3N2由来の特徴を持っている。PB1-F2が発現すると細菌感染による二次感染を重篤化させることが分かっている⁵⁾が、AH1pdm09は3か所(12番目, 55番目, 88番目)に終止コドンがありPB1-F2は発現していない¹⁾。県域の分離株からもPB1-F2が発現した株は見つからなかった。

表1 インフルエンザウイルスの病原性に影響する因子の特徴および調査項目

因子	病原性への関与	初期流行株の特徴	調査項目
PB1	PB1-F2蛋白が発現すると細菌感染による二次感染を重篤化させる	未発現	PB1-F2蛋白の発現
PB2	E627K変異したウイルスは病原性が強くなる	E	E627K変異
HA	欧州の重症例の一部にD222G変異がみられる	D	D222G変異
NS	C末端が欠損すると病原性が弱くなる	欠損	C末端の復活

表2 AH1pdm09分離株の調査数

		計	インフルエンザシーズン*						
			2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014	2014/2015
重症例 29	死亡	3	0	3	0	0	0	0	0
	脳症	12	0	11	1	0	0	0	0
	肺炎	14	0	10	2	0	0	2	0
軽症例		48	10	10	10	0	3	8	7

* 9月から翌年8月まで

表3 プライマーセット

	増幅用	シーケンス用
PB1	A/PB1-f 5'-GAATGGATGTCAATCCCAC-3'	増幅用と同じ
	AH1pdm/PB1-448r 5'-AGACTTCTATGGTGTGGCC-3'	
PB2	A/PB2-1654f 5'-TGGATMATCAGRAAYTGGGA-3'	増幅用と同じ
	A/PB2-2277r 5'-ATTGATGGCCATCCGAATTC-3'	
HA ³⁾	H1HA1-BIGIN 5'-AGCAAAAGCAGGGAAAATAA-3'	swineH1-56-76F 5'-CATTATGTATAGGTTATCATG-3'
	swineH1-1106-1087R 5'-TGATAACCGTACCATCCATC-3'	swineH1-596-578R 5'-GGATGGTGAATGCCCCATA-3'
		swineH1-768-788F 5'-AATAACATTCGAAGCAACTGG-3'
		swineH1-1106-1087R 5'-TGATAACCGTACCATCCATC-3'
NS	AH1pdm/NS-f 5'-ATGGACTCCAACCATGTC-3'	増幅用と同じ
	AH1pdm/NS-r 5'-CATTAATAACGTGAAACG-3'	

A/California/7/2009 の GenBank Accession No. : (PB1)FJ969531, (PB2)FJ969530, (HA)FJ969540, (NS)FJ969538

PB2は宿主範囲の決定に関与する蛋白で、増殖効率や増殖至適温度に影響する。1997年に香港で分離されたAH5N1の場合は、627番目のアミノ酸がトリ型 (E) からヒト型 (K) に変異 (E627K) した結果、ウイルスの病原性が強くなり患者を死に至らしめたことが分かっているが⁶⁾、AH1pdm09の場合は北米のトリ由来の特徴を持ち、627番目はトリ型 (E) である¹⁾。県域の分離株からもE627K変異は見つからなかった。

NS1はウイルス粒子に含まれない非構造蛋白であり、AH1pdm09の場合は古典的ブタ由来株の特徴を持って

いる。AH1pdm09ではC末端が欠損しているために増殖力が低下していると考えられている^{1, 7)}。県域の分離株すべて220番目に終止コドンがあり、C末端は欠損していた。

HAは宿主細胞へのレセプター結合性を決定する蛋白で、AH1pdm09の場合は古典的ブタ由来株の特徴を持っている。1918年のスペインかぜの場合は、187番目がトリ型 (E) からヒト型 (D) の変異 (E187D) が初期に起き、加えて222番目がトリ型 (G) からヒト型 (D) へ変異 (G222D) した後に大流行したが⁸⁾、

AH1pdm09の場合は両方とも最初からヒト型 (D) であり¹⁾, 県域の分離株も同様にヒト型 (D) であった。しかし, 欧州の重症例患者の一部から該当部分がトリ型に変異 (D222G) しているものがあると報告されており⁹⁾, 今後も注目して解析する必要があると思われる。HAの進化系統樹を図1に示した。県域では, パンデミックが発生した2008/2009シーズンの後半から2009/2010シーズンにかけて, 2010/2011シーズン, 2013/2014シーズンにAH1pdm09の流行がみられたが, 2011

/2012シーズンは検出が無く, 2012/2013シーズンと2014/2015シーズンは散発的な検出にとどまった。2008/2009および2009/2010シーズンの分離株はS203T変異をもつグループ1を形成し, 2010/2011と2012/2013シーズンの分離株はS203T, A197T, S185T変異をもつグループ2を形成し, 2013/2014と2014/2015シーズンの分離株はS203T, S185T, D97N, T197A, K163Q変異をもつグループ3を形成していた。

表 4 重症例における病原性に関する遺伝子の解析結果

株名	PB1	PB2	HA	NS
	PB1-F2発現	E627K変異	D222G変異	NS1-C末端
ワクチン株 A/Califolnia/7/2009	未発現	E	D	欠損
初期軽症例 A/Kanagawa/137/2009	未発現	E	D	欠損
死亡例 A/Kanagawa/335/2009	未発現	E	D	欠損
死亡例 A/Kanagawa/374/2009	未発現	E	D	欠損
死亡例 A/Kanagawa/384/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/275/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/308/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/315/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/326/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/328/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/329/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/341/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/356/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/377/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/378/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/391/2009	未発現	E	D	欠損
脳症例 A/Kanagawa/34/2011	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/276/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/278/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/350/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/351/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/365/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/371/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/380/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/383/2009	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/10/2010	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/54/2010	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/38/2011	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/42/2011	未発現	E	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/44/2014	ND	ND	D	欠損
肺炎例 A/Kanagawa/79/2014	ND	ND	D	欠損

ND : シークエンス未実施

A/Califolnia/7/2009 の GenBank Accession No. : (PB1)FJ969531, (PB2)FJ969530, (HA)FJ969540, (NS)FJ969538

A/Kanagawa/137/2009 の GenBank Accession No. : (PB1)GU136037, (PB2)GU136070, (HA)GU014792, (NS)GU136006

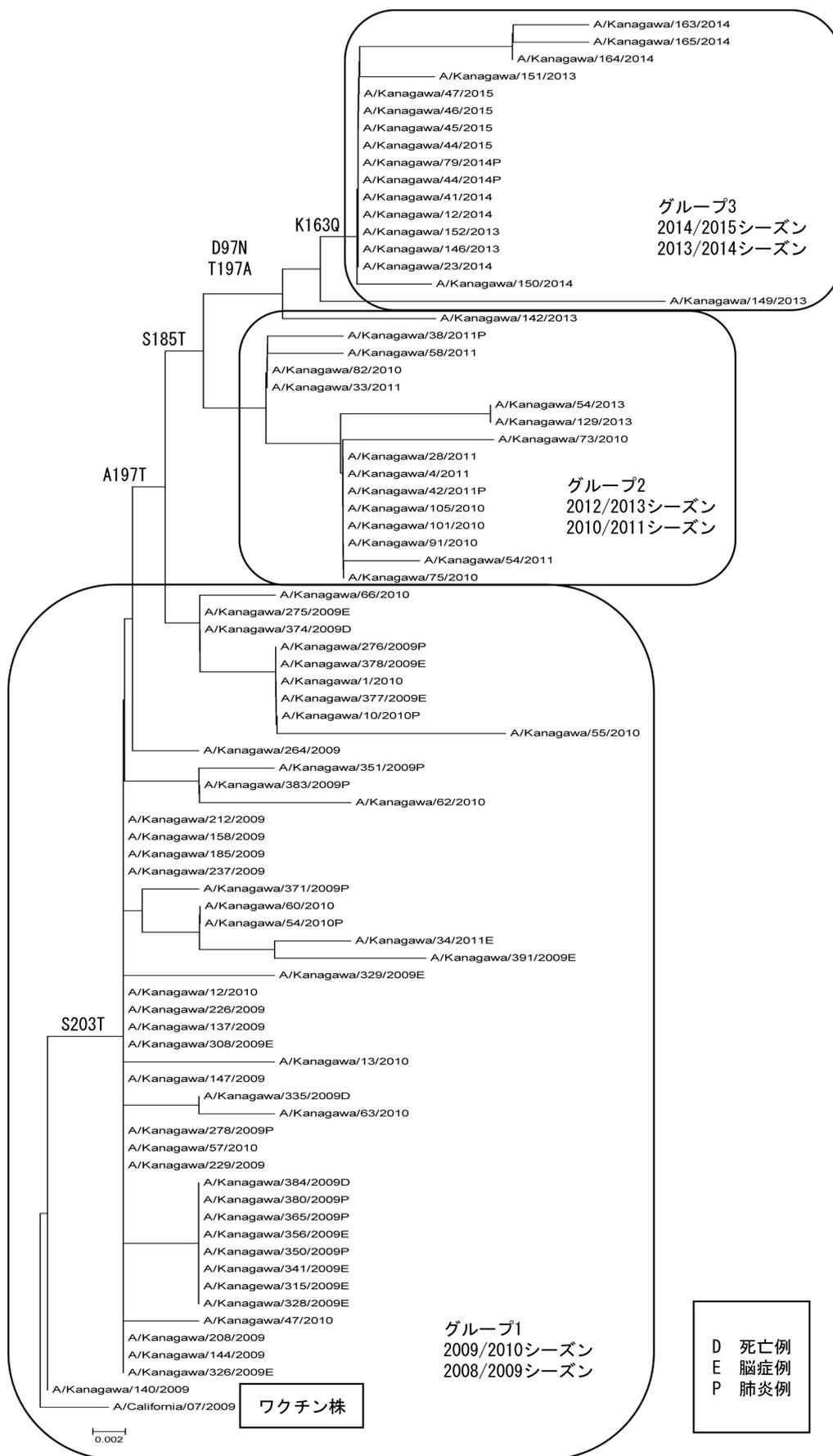


図4 AH1pdm09株のHA遺伝子NJ系統樹 (236AA)

29例の重症例の遺伝子解析結果からは、重症化に係ると考えられる遺伝子変異は確認されず、調査対象とした部分の遺伝子はパンデミック初期から変異していないことがわかった。一方、5シーズン分のHA遺伝子解析では、軽症例、重症例の別なく概ねシーズン毎にグループを形成しており、遺伝子変異の蓄積が起きている様子が伺えた。現段階では、重症化の要因は、ウイルス側の遺伝子変異よりも宿主側に何らかの要因が存在するのではないかと推察される。

AH1pdm09はパンデミックに続くシーズンの後も、2013/2014シーズンに流行がみられたことから、季節性インフルエンザとして定着したと考えられる。今後も、ほかの季節性インフルエンザと共に薬剤耐性や病原性の変化などに注目しながら監視を続けていく必要があると考える。

最後になりましたが、検体採取および患者情報の収集にご協力いただきました医療機関の先生方および県域各保健福祉事務所職員の皆様に深謝いたします。

本研究の一部は、平成25年度神奈川県公衆衛生協会調査研究助成金を受けて実施した。

(平成27年8月1日受理)

文 献

- 1) 杉田繁夫：インフルエンザの世界的広がり（分子疫学），インフルエンザ，11，31-48（2010）
- 2) 加地正郎：インフルエンザの流行史，インフルエンザとかぜ症候群，改訂2版，加地正郎編，pp.5-15，南山堂，東京（1997）
- 3) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル（第2版）
- 4) Zou,S. : A practical approach to genetic screening for Influenza virus variants , J.Clin. Microbiol., **35**, 2623-2627 (1997)
- 5) Zamarin,D., Ortigoza,M.B. and Pakese,P. : Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice, J.Virol., **80**, 7976-7983 (2006)
- 6) Hatta,M., Gao,P., Halfmann,P. and Kawaoka, Y. : Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses, Science, **293**, 1840-1842 (2001)
- 7) Glaser,L., Steevns,J., Zamarin,D., Wilson,I.A., Garcia-Sastre,A., Tumper,T.M., et al. : A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding sepecificity, J.Virol., **79**, 11533-11536 (2005)
- 8) Liu,Y., Childs,R.A., Matrosovich,T., Wharton,S., Palma,A.S., Chai,W., et al. : Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1)2009 influenza virus, J. Virol., **84**, 12069-12074 (2010)
- 9) Garten,R.J., Davis,C.T., Russell,C.A., Shu,B., Lindstrom,S., Balish,A., et al. : Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans : Science, **325**, 197-201 (2009)