

1999/2000シーズンに分離されたAソ連型インフルエンザウイルス変異株の解析

Antigenic Analysis of Influenza A Virus (H1) Isolated in 1999/2000 Season

後藤 郁男 植木 洋 佐藤 千鶴子
沖村 容子 野呂 知世*¹ 秋山 和夫

Ikuo GOTO, Yo UEKI, Chizuko SATO
Yoko OKIMURA, Tomoyo NORO, Kazuo AKIYAMA

キーワード：A型インフルエンザウイルス，H1，抗原解析，塩基配列，遺伝子解析

Key Words：Influenza A Virus，H1，Antigenic Analysis，Nucleotide Sequence，Gene Analysis

1999/2000シーズンに分離され、抗原変異が示唆されたAソ連型インフルエンザウイルスについて血清学的及び分子生物学的に解析を実施したところ、同シーズンのワクチン株とHAタンパク抗原決定部位のアミノ酸配列が異なっていた。また、これら分離株の塩基配列並びにアミノ酸配列は2000/2001のワクチン株と類似しており、連続抗原変異した株であることが明らかとなった。

1 はじめに

インフルエンザが毎年流行し、再感染する理由の一つとして、インフルエンザウイルス表面抗原である赤血球凝集素（HA：hemagglutinin）の抗原変異があげられる。この抗原変異には、HAをコードしているインフルエンザウイルスゲノム第4分節上の塩基配列の変化による連続変異と、インフルエンザゲノムの再集合によって生ずる不連続変異がある¹⁾。ここ最近、不連続変異によるパンデミックの可能性も指摘されているが^{2,3)}、保健環境センターでは分離ウイルス株のHAに対する抗血清の反応性の違いをもとに、主に連続変異について解析を行い⁴⁾、シーズン中あるいは次シーズンの流行予測に資するデータ収集に務めている。

今回著者らは、1999/2000シーズンに仙台市在住のインフルエンザ患者よりHAの抗原性がワクチン株とは異なるインフルエンザウイルスを分離し、その血清学的及び分子生物学的解析を行い知見が得られたので報告する。

2 材料と方法

2.1 ウイルスの分離・同定

調査研究の一環として仙台市内の医療機関で採取された咽頭拭い液を材料とし、トリプシン加MDCK細胞を用いた培養法により、インフルエンザウイルスの分離を行った。継代培養を2代実施して、MDCK細胞に細胞変性効果（CPE：cytopathic effect）が認められ、赤血球凝

* 1 光ヶ丘スベルマン病院小児科

集能を有した検体をウイルス分離陽性とした。ウイルスの同定は、インフルエンザ同定用抗血清（国立感染症研究所分与、A/北京/262/95、A/シドニー/5/97、B/山東/7/97、B/山梨/166/98）による赤血球凝集抑制試験（HI：hemagglutinin inhibition test、0.5%モルモット赤血球使用）で行った。

2.2 PCRによる型別判定

ウイルスゲノムの抽出はスマイテスト（住友金属）を使用した。PCRによるインフルエンザウイルスのHA型別判定は、高尾ら⁵⁾のミックスプライマーを用いたRT-PCR法で行った。

2.3 シークエンス

Nakajimaら⁶⁾が報告したプライマーを使用し、インフルエンザウイルスHA遺伝子のHA 1領域を増幅した。増幅産物のシークエンスはダイターミネーター法によるダイレクトシークエンス（ABI PRISM 310, PERKIN ELMER）で行った。

2.4 遺伝子解析

シークエンス結果の解析はパーソナルコンピューターソフト、GENTIX-MAC及びclustalxを使用した。

3 結果

3.1 ウイルス分離及び抗原解析

1999/2000シーズンは共同研究医療機関より43件の咽頭拭い液が搬入され、そのうちAソ連型インフルエンザウイルスが9件、A香港型インフルエンザウイルスが4

件分離された。Aソ連型と同定された分離株はワクチン株A/北京/262/95の抗血清に対するHI価が低い傾向を示した。特に検体番号S31とS32はMDCK細胞に明瞭なCPEを起こし、赤血球凝集能も認められたものの、HI試験ではワクチン株に対するHI価が10倍と低値で、同定が困難であった(表1)。

表1 HI試験結果

分離されたAソ連型インフルエンザウイルスの抗原解析結果を示した。アンダーラインはホモ値を示す。

検体番号	参照株及び試験ウイルス株	抗血清			
		A/北京/262/95	A/シドニー/5/97	B/山東/7/97	B/山梨/166/98
A/北京/262/95	A/北京/262/95	320	< 10	< 10	< 10
A/シドニー/5/97	A/シドニー/5/97	< 10	640	< 10	< 10
B/山東/7/97	B/山東/7/97	< 10	< 10	160	< 10
B/山梨/166/98	B/山梨/166/98	< 10	< 10	< 10	160
S05	A/宮城/59/99	40	< 10	< 10	< 10
S20	A/宮城/72/99	160	< 10	< 10	< 10
S21	A/宮城/73/99	160	< 10	< 10	< 10
S26	A/宮城/81/99	80	< 10	< 10	< 10
S27	A/宮城/82/99	80	< 10	< 10	< 10
S30	A/宮城/87/99	40	< 10	< 10	< 10
S31	A/宮城/3/2000	10	< 10	< 10	< 10
S32	A/宮城/4/2000	10	< 10	< 10	< 10
S33	A/宮城/2/2000	80	< 10	< 10	< 10

検体番号S31, S32の分離ウイルスについて、インフルエンザ亜型の決定を目的にPCRを実施したところ、図1のようにAソ連型(H1)に特異的な512bpのバンドが検出され、両ウイルスはAソ連型インフルエンザウイルスと同定された(ウイルス名はそれぞれA/宮城/3/2000及びA/宮城/4/2000)。

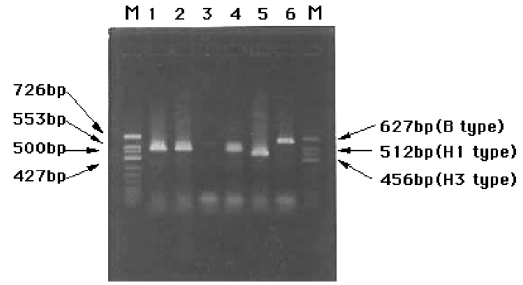


図1 インフルエンザ型別PCR

- 1: 検体S31ウイルス培養上清
- 2: 検体S32ウイルス培養上清
- 3: Negative Control
- 4: Aソ連型(H1)ウイルス
- 5: A香港型(H3)ウイルス
- 6: B型ウイルス
- M: Marker

3.3 シークエンス及びアミノ酸配列の比較

分離株A/宮城/3/2000及びA/宮城/4/2000はPCRの結果よりH1型と判明したが、HI試験での同定は困難であったことから、抗原性の変化が示唆された。そこで、この2つの分離株に加え、A/北京/262/95様の分離株A/宮城/2/2000のHA遺伝子のダイレクトシークエンスを実施し、ワクチン株A/北京/262/95(1999/2000シーズン)と、A/New Caledonia/20/99(2000/2001シーズン)との比較を行った(図2)。その結果、上述の3分離株はA/北京/262/95と30ないしは31塩基異なり(相同性は98.1%)、A/New Caledonia/20/99により類似していた(相同性は99.7%)。さらに、A/宮城/3/2000及びA/宮城/4/2000の両株とA/宮

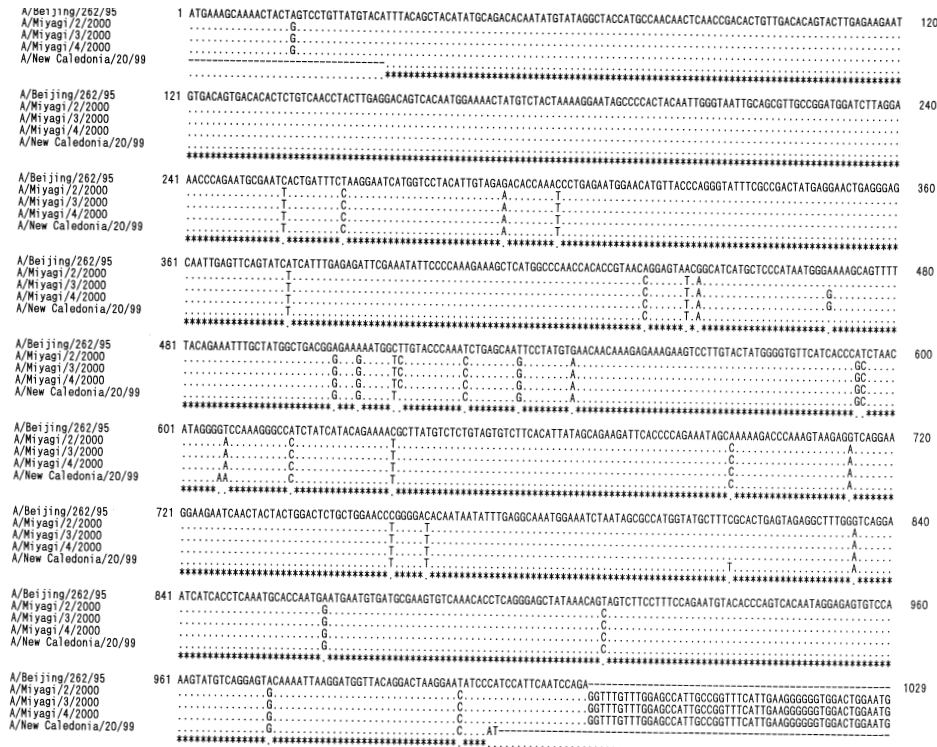


図2 分離株及びワクチン株HA1領域の塩基配列

A/Beijing/262/95株の塩基配列はLosalamos Laboratory Influenza Sequences Database (accession number ISDNAX127), A/New Caledonia/20/99株の塩基配列はEMBL (accession number AJ344014) より引用した。

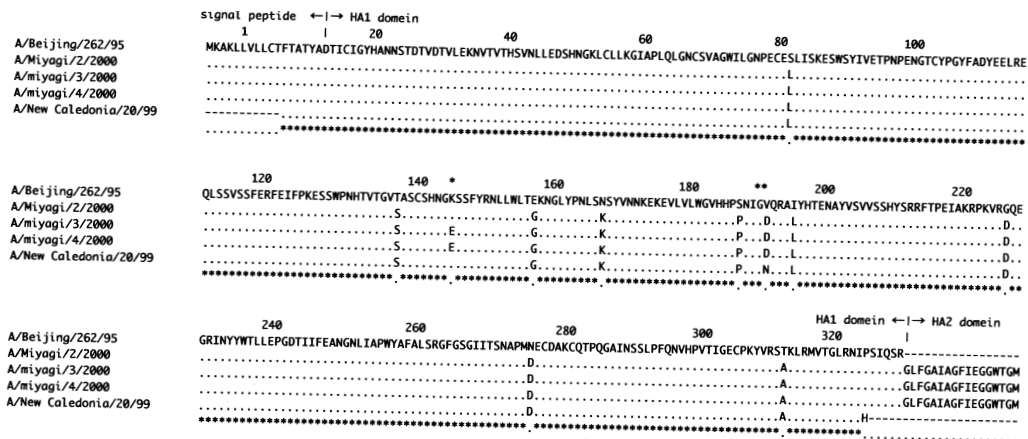


図3 分離株及びワクチン株HA1領域のアミノ酸配列

アミノ酸配列の番号はWinterら⁷⁾の報告に基づき付した。* : 変異株のアミノ酸が他の株と異なる位置を示す。
** : 分離株のアミノ酸が2ワクチン株と異なる位置を示す。ワクチン株の引用は図2と同様。

城/2/2000を比較すると、第469番目の塩基が異なっていた(A G, 図2)。

また、得られたシーケンス結果を元に塩基配列から推定されるアミノ酸配列について、株間の比較を行ったところ、3分離株はワクチン株A/北京/262/95と10~11アミノ酸残基異なっており、塩基配列と同様にワクチン株A/New Caledonia/20/99に類似していた。そのうち2分離株は塩基配列を反映して、さらに第144番目のアミノ酸がLys Gluへと変化していた(図3、アミノ酸の位置は文献番号7のA/PR/8/83の配列を元に示した)。

4 考 察

A型インフルエンザウイルスのHAタンパクは、ウイルスエンベロープに埋め込まれている表面タンパクの一つで、スパイクと呼ばれる突起構造物を形成している。その機能は宿主細胞のレセプターに結合し、膜融合活性をもとにウイルス粒子の細胞内侵入を助けるもので、ウイルス感染において重要な役割を担っている。このHAはウイルス表面に露出していることから、中和活性を持つ抗体産生を誘導する抗原となり、生体においては感染抑制効果を生み出す。しかし、ウイルス遺伝子が頻繁に変異を起こすことからHAの抗原性が変化し、毎年のインフルエンザの流行は変異を起こしたウイルスが引き継ぐ形で発生する。我々をはじめとする全国の地方衛生研究所では、国立感染症研究所と連携を取りながら分離ウイルス株の抗原性について血清学的な解析を行い、インフルエンザの流行について情報提供を行っている⁸⁾。この血清学的な抗原解析は各シーズンのワクチン株に対する抗血清を中心に行われており、時として免疫学的に抗原変異を示唆するウイルスに遭遇する。今回著者らは抗原変異が疑われたAソ連型インフルエンザウイルスを分離し、従来の血清学的な解析に加え分子生物学的な解析を行うことによって、その詳細を明らかにした。すなわち、HA1フラグメントをコードしているインフルエンザウイルス第4分節遺伝子の塩基配列を解読したところ、3分離

株はワクチン株であるA/北京/292/95と特定の塩基の違いを保有しており、この違いがアミノ酸の変化をもたらしていた(図2, 3)。特に2変異株(A/宮城/3/2000, A/宮城/4/2000)は他の分離株(A/宮城/2/2000)と比較してさらに1アミノ酸残基が異なっていた。Catonら⁹⁾の解析によればHA1フラグメントの中でエピトープとなる部位が5カ所(図4 Sa, Sb, Ca1, Ca2, Cb領域)特定されているが、今回変異がみられたアミノ酸の位置はCa2領域にあたる(図4にその位置を示した)ことから、この部位の変異によりHI用抗血清との反応性の違いが生じたものと考えられた。しかも、このアミノ酸変異は塩基性側鎖を持つLysから酸性側鎖を持つGluへの変化であることから、単なるタンパク質一次構造の変化にとどまらず、高次構造に影響している可能性が高く、このことがHI用抗血清と反応性が乏しい理由と推察された。

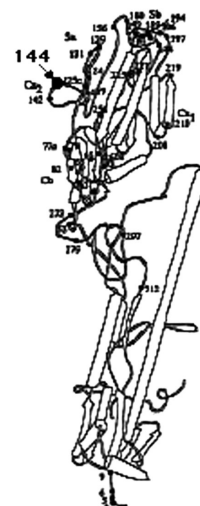


図4 インフルエンザウイルスHAタンパクの3次構造模式図

HA1量体にアミノ酸変異が認められた部位(144位)を示した(文献番号6より一部改変して引用)。
Sa, Sb, Ca1, Ca2, CbはそれぞれAソ連型HA1領域における主要抗原決定部位を表す。

一般的にウイルス遺伝子にみられる塩基のpoint mutationは、ウイルスの複製過程においてゲノムRNAの相補鎖合成中に過った塩基を取り込むことによって生じる突然変異によるもので、インフルエンザの一回の感染サイクルにおける変異の発生率は、塩基座当たり 1.5×10^{-5} であることが示されている¹⁰⁾。したがって、ウイルスの感染により生体内では多くの変異株が出現しうが、変異がウイルスの生存や感染増殖時に必要とされるタンパクに生じた場合は淘汰され、他者に感染することはまれである。アミノ酸において変異を起こした2分離株もその可能性が考えられるが、これらのウイルスは、同一時期の検体から分離されていること、また検体提供者は同一小学校の同一学年の児童であったこと（データは示していない）から、検体提供者には接点があり、分離された変異ウイルスは*in vivo*で感染能力を保有していたものと考えられた。なお、今回分離された変異株と同様に抗原解析用の抗血清に対して低いHI価を示すウイルス株が宮城県の2株を含め6都道府県で計15株分離されている¹¹⁾。

また、明らかな抗原変異を伴った2分離株以外の株も、ワクチン株A/北京/262/95の抗血清に対するHI価は低い傾向を示したが、シーケンスの結果から、これらはA/北京/262/95から抗原連続変異したと考えられる次シーズンのワクチン株であるA/New Caledonia/20/99との相性がより高いことが判明した。全国の調査結果でも1999/2000シーズンは同類似株が71%を占め、A/New Caledonia/20/99様ウイルスの増加傾向が把握されている¹¹⁾。この点に関しては分離ウイルスの血清学的抗原解析を行いさらに検討する必要がある。

本研究では、従来行われてきたインフルエンザウイルスの血清学的抗原解析に加え、分子生物学的な解析を行うことによって抗原変異が起りやすいインフルエンザ

ウイルスについて詳細な解析データが得られた。このことから、今後は分析方法の簡便化を図りながら両方法を実施・比較することによってインフルエンザ流行予測により寄与できるものと考えられた。

5 ま と め

- 1) 1999/2000シーズン分離インフルエンザウイルスはワクチン株と塩基、アミノ酸レベルで異なっていた。
- 2) 分離された変異株は、HA抗原決定基のアミノ酸が変化していた。
- 3) インフルエンザの分子生物学的解析は抗原解析法の一つとして有用であった。

参 考 文 献

- 1) B. N. Fields, et al: Fields Virology, Third Edition, 1397~1445 (1996)
- 2) H. Kida, et al: Current Topics in Medical Virology, 365~376 (1989)
- 3) 西村秀一: 日本臨床, 55(10), 2617~2626 (1997)
- 4) 上村弘他: 宮城県保健環境センター年報, 14, 46~50 (1996)
- 5) 高尾信一他: 広島県保健環境センター研究報告, 2, 9~13 (1994)
- 6) S. Nakajima et al: Microbiol. Immunol., 44(10), 841~847 (2000)
- 7) G. Winter et al: Nature, 292(2), 72~75 (1981)
- 8) 根路銘国昭他: 日本臨床, 55(10), 2527~2534 (1997)
- 9) A. J. Caton and G. G. Brownlee: Cell, 31, 417~427 (1982)
- 10) J. D. Parvin et al: J. Virol., 59, 377~383 (1986)
- 11) 国立感染症研究所発行: 病原微生物検出情報, 21(12), 262~265 (2000)