

インフルエンザウイルス分離株についての遺伝子解析

研究分担者 藤崎 誠一郎

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・主任研究官

研究要旨

2014/15～2017/18 シーズンのインフルエンザウイルス分離株について遺伝子解析を実施した。A(H1N1)pdm09 ウイルスは、クレード 6B 内にサブクレード 6B.1, 6B.2 が出現し、6B.1 が流行の主流となった。A(H3N2) ウイルスは 3C.2a が主流でありシーズンを経るにつれサブクレードが多様化し、大別すると 3C.2a 内に 4 つの集団が形成された。B 型では、Yamagata 系統は各シーズンを通してクレード 3 が流行した。Victoria 系統ではクレード 1A が流行しているが、アミノ酸欠損または置換を有する抗原性変異株集団が派生した。各亜型・系統のウイルスにも遺伝子変異の蓄積が認められ遺伝子系統樹上では明確に区別される集団が複数確認される。抗原性の変異したウイルスが出現・伝播する可能性は否定できないため、今後もウイルスの発生とその遺伝子の特徴を把握していくことが重要である。

A. 研究目的

国内外から流行株を収集し、それらの遺伝子配列に基づいた進化系統樹解析、抗原性および薬剤耐性アミノ酸の検出を行う。これらの結果から、特定のアミノ酸が抗原性や薬剤耐性に与える影響を解析し次シーズンの流行予測および適切なワクチン株の選定に役立てる。

B. 研究方法

2014/15 シーズンから 2017/18 シーズンにかけて国内および海外（ラオス、台湾、モンゴル、韓国、ミャンマー、ネパール、インド）から分与された分離株について遺伝子配列を決定し、アミノ酸解析、進化系統樹解析を実施した。具体的には、上記シーズンを通して A(H1N1)pdm09 を 817 株、A(H3N2) を 1343 株、B 型を 1102 株、解析を行った。ウイルスからの核酸抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)、核酸増幅の RT-PCR には SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher)、シークエンシン

グには 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) および MiSeq (Illumina) を用いた。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 ウイルス：HA 遺伝子系統樹上で、2014/15 シーズンにはクレード 1～8 の 8 つに区分されていたが、流行の主流であるクレード 6 はサブクレード 6A, 6B, 6C に分岐した。2015/16 シーズンには分離株は全て 6B に分類され、さらに 6B.1 (アミノ酸置換:S84N, S162N, I216T、代表株：A/Michigan/45/2015 株、A/Singapore/GP1908/2015 株)、6B.2 (V152T, V173I, E491G, D501E) が出現した。2016/17 シーズンには S74R, S164T, I295V を持つ集団が発生し流行の主流となった。また、NA タンパク質に薬剤耐性マーカーのアミノ酸置換 H275Y を有する株は稀に検出されたが、流行は確認されていない。

A (H3N2) ウイルス : HA 遺伝子系統樹においてクレード 3C はサブクレード 3C.1, 3C.2 (N145S, D489N), 3C.3 (T128A, R142G, N145S) に分かれており、さらに 3C.2a (L3I, N144S, K160T, N255D, Q311H, F159Y、代表株 : A/Hong Kong/4801/2014 株) と 3C.3a (A138S, F159Y, N225D)、および 3C.3b (E62K, K83R, M347K) に細分化していた。2014/2015 シーズン以降、流行株の主流は 3C.2a とその派生ウイルスである。2016/2017 シーズンには 3C.2a 内に複数のクレードが形成され、サブクレード 3C.2a1 (N171K, I406V, G484E、代表株 : A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 株) が主流となった。2017/18 シーズンには、3C.2a 内に 3C.2a1 以外にも複数の集団の流行が確認され、3C.2a1a (3C.2a1 + N121K, G479E, T135K, N122D), 3C.2a1b (3C.2a1 + N121K, K92R, H311Q), 3C.2a1b + 135K (3C.2a1b + E62G, R142G, T135K), 3C.2a1b + 135N (3C.2a1b + T135N), 3C.2a2 (T131K, R142K, R261Q), 3C.2a3 (N121K, S144K), 3C.2a4 (N31S, D53N, R142G, S144R, N171K, I192T, Q197H) と細分化した。これらのウイルスが有するアミノ酸置換に依る抗原性への影響は明らかにされていない。

B 型ウイルス : Yamagata 系統分離株は全て、各シーズンを通して HA タンパク質に S150I, N165Y, N202S, S229D を持つクレード 3 (代表株 : B/Wisconsin/1/2010、B/Phuket/3073/2013) に属した。Victoria 系統の分離株は全て、HA タンパク質に N75L, N165K, S172P アミノ酸置換を持ち、B/Brisbane/60/2008 株を代表とするサブクレード 1A に属した。海外で報告されている抗原性変異株群のうち、2 アミノ酸欠損株 (162, 163 位)、3 アミノ酸欠損株 (162-164 位)、および 2 アミノ酸置換株 (K165N, T221I) は散発的に検出されているが現時点では流行は確認されていない。

D. 考察

4 シーズンを通して A (H3N2) 亜型ウイルスは遺伝子変異の蓄積とアミノ酸の多様化が特徴的と言える。各ウイルス集団が有するアミノ酸置換には抗原部位近傍と考えられるものもあり、今後、抗原性変異ウイルスの出現に注視したい。A (H1N1) pdm09 亜型もパンデミック発生から約 9 年が経過しアミノ酸置換が蓄積されてきた。抗原性変異株はほとんど報告されていないが、引き続き注意が必要であろう。B 型については、数年前までとは異なり流行のパターンが変化し、シーズンの早い時期からウイルスの検出が報告される場合がある。山形系統ウイルスは他の亜型・系統に比べ遺伝子の多様性が低い、大きく流行することがあり興味深い。ビクトリア系統ウイルスは 2017/18 シーズンに抗原性変異株の発生・流行が海外で報告された。現時点で日本では検出例が少ないが来シーズン以降に流行を引き起こす可能性は否定できない。変異を迅速に捉えるために、流行シーズン以外でも報告されるウイルスに注意し継続した監視が必要である。

E. 結論

A (H1N1) pdm09 ウイルスには抗原性変異株の流行は報告されていない。A (H3N2) ウイルスは、多様化した各サブクレードのウイルスが持つアミノ酸置換と抗原性の関係および、今後の流行状況に注意したい。B 型はビクトリア系統に出現した各抗原性変異株群が伝播するのか懸念される。いずれのウイルスについても、遺伝子の変異と流行の変化に注意深く監視を続ける必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of a

- large cluster (outbreak) of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir during(in) the 2013-14 influenza season in Japan., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 59(5), 2607-17, 2015
- Nakamura K, Shirakura M, Suzuki Y, Naito T, Fujisaki S, Tashiro M, Nobusawa E., Development of a high-yield reassortant influenza vaccine virus derived from the A/Anhui/1/2013 (H7N9) strain., *Vaccine*, 34(3), 328-33, 2016
 - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69(1), 83-6, 2016
 - Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T., Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014., *Emerging Infectious Diseases.*, 22(3), 557-9, 2016
 - Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Shimazu Y, Shimomura T, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan., Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir due to a dual H275Y/G147R substitution, Japan, March 2016., *Euro surveill.*, 21(24),, 2016
 - Takashita E, Ejima M, Ogawa R, Fujisaki S, Neumann G, Furuta Y, Kawaoka Y, Tashiro M, Odagiri T., Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir., *Antiviral Res.*, 132, 170-7, 2016
 - 渡邊真治, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 香港型インフルエンザウイルスの最近の変異(性状変化), *インフルエンザ*, Vol.17 No. 3, 37-44, 2016
 - Yokoyama M, Fujisaki S, Shirakura M, Watanabe S, Odagiri T, Ito K, Sato H., Molecular Dynamics Simulation of the Influenza A(H3N2) Hemagglutinin Trimer Reveals the Structural Basis for Adaptive Evolution of the Recent Epidemic Clade 3C.2a., *Front Microbiol.*, 8, 584, 2017
 - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S., Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015., *Influenza Other Respir Viruses.*, 11(5), 399-403, 2017
 - Nakamura K, Shirakura M, Fujisaki S, Kishida N, Burke DF, Smith DJ, Kuwahara T, Takashita E, Takayama I, Nakauchi M, Chadha M, Potdar V, Bhushan A, Upadhyay BP, Shakya G, Odagiri T, Kageyama T, Watanabe S., Characterization of influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated from Nepalese and Indian outbreak patients in early 2015., *Influenza Other Respir Viruses.*, 11(5), 399-403, 2017
 - Imai M, Watanabe T, Kiso M, Nakajima N, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta

- M, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T, Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y., A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from A Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets., *Cell Host Microbe.*, 22(5), 615-26, 2017
- Uda K, Shoji K, Koyama-Wakai C, Furuichi M, Iwase N, Fujisaki S, Watanabe S, Miyairi I., Clinical characteristics of influenza virus-induced lower respiratory infection during the 2015 to 2016 season., *J Infect Chemother.*, pii: S1341-321X(18)30007-2., 2018
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Watanabe S, Odagiri T., Isolation of egg-adapted influenza A(H3N2) virus without amino acid substitutions in the antigenic sites of its hemagglutinin., *Jpn J Infect Dis.*, (In press)
2. 学会発表
- Genetic diversity of AH3 influenza virus prevalent in the 2016/17 season
Chiharu Kawakami, Shigeo Sugita, Seiichiro Fujisaki, Kazuya Nakamura, Miwako Saikusa, and Shuzo Usuku
第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017
- Characterizations of cell-derived and egg-passaged A/Saitama/103/2014 virus,
Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Emi Takashita, Hitoshi Takahashi, Noriko Kishida, Aya Sato, Rie Ogawa, Hideka Miura, Miki Akimoto, Hiromi Sugawara, Noriko Suzuki, Shinji Watanabe, Takato Odagiri
第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017
- 2016/17 シーズンに流行した AH3 型インフルエンザウイルスの特徴と遺伝子解析
七種美和子、宇宿秀三、笹尾忠由、豊澤隆弘、藤崎誠一郎、中村一哉、渡邊真治
第 49 回日本小児感染症学会総会・学術集会、金沢、2017
- Growth capabilities of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting

enhanced cross-resistance to oseltamivir and peramivir

Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Shinji Watanabe, Takato Odagiri

6th ESWI Influenza Conference, Latvia, 2017

- 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、白倉雅之、三浦秀佳、中村一哉、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 2015/16 シーズンに検出されたオセルタミビル・ペラミビルに強い耐性を示すインフルエンザウイルス 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2016

- 宇田 和宏、古市 宗弘、小山 ちとせ、岩瀬 徳康、藤崎誠一郎、渡邊 真治、庄司 健介、宮入 烈 2015-16年シーズンのインフルエンザ下気道炎の臨床的特徴 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2016

Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Yukie Shimazu, Takeshi Shimomura, Ikuko Doi, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H1N1)pdm09 viruses exhibiting enhanced crossresistance

to oseltamivir and peramivir in the 2015/16 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016

- Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Noriko Kishida, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Rie Ogawa, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka

Miura, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Takato Odagiri. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2015/2016 season and vaccine viruses for the 2016/17 season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016

- Noriko Kishida, Masaki Imai, Akira Ainai, Reiko Saito, Kazuya Nakamura, Tomoko Kuwahara, Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Masayuki Shirakura, Yoshiko Kashiwagi, Masato Tashiro, Takato Odagiri, Shinji Watanabe. Evaluation of efficacy of an inactivated whole-virus A/Victoria/361/2011 (IVR-165) (H3N2) influenza vaccine in ferret. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016

- Chiharu Kawakami, Seiichiro Fujisaki, Emi Takashita, Miwako Saikusa, Syuzo Usuku, Shinji Watanabe. Characterization of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Isolated from Hospitalized Cases in the 2015/16 Season. 第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016

- E Takashita, S Fujisaki, N Gabriele, Y Furuta, Y Kawaoka, M Tashiro, T Odagiri. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

- S Watanabe, K Nakamura, S Fujisaki, M Shirakura, E Takashita, N Kishida, T Kuwahara, A Sato, R Ogawa, H Sugawara, M Akimoto, H Miura, T Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan. Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for

the 2015/2016 season. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

- C Kawakami, E Takashita, S Fujisaki, M Saikusa, S Usuku, T Odagiri, K Mitamura. Genetic analysis of influenza B viruses isolated during the five seasons in Yokohama. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015
- 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況 第 47 回日本小児感染症学会、福島、2015
- C Kawakami, K Shimizu, S Usuku, K Mitamura, E Takashita, S Fujisaki, T Odagiri. Gene Analysis of Influenza B Viruses in Yokohama during the Past 5 Seasons. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015
- E Takashita, M Kiso, S Fujisaki, M Yokoyama, K Nakamura, M Shirakura, H Sato, T Odagiri, Y Kawaoka and M Tashiro. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013/2014 Influenza Season in Japan. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 健康危険情報

該当なし