

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

2017/18 から 2020/21 シーズンの 3 年間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、A(H3N2)、B 型ビクトリア系統ウイルスに、遺伝子的多様化が進み複数の集団が形成された。抗原性変異を引き起こすアミノ酸置換を有する集団も出現した。2020/21 シーズンは流行規模が極めて小さかったが、次の流行に備え引き続きウイルス伝播と遺伝子の変化に注意が必要である。

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

2017/18 から 2020/21 シーズンの 3 年間に、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）から収集し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、A(H1N1)pdm09 を 1158 株、A(H3N2) を 895 株、B 型を 689 株、解析を行った（2021 年 3 月時点）。

（倫理面への配慮）

なし

C. 研究結果

A(H1N1)pdm09 ウイルス：HA 遺伝子系統樹上で、2017/18 シーズンの流行株は 6B.1（代表株：A/Singapore/GP1908/2015）であったが、2018/19 シーズンに S183P を含む 7 群（183P-1：N451T、183P-2：

L233I、183P-4：N129D+A141E、183P-5：N260D、183P-6：T120A、183P-7：K302T+I404M）に分岐した。その後 2019/20 シーズンには流行株は全て 183P-5 となった。183P-5 はさらに派生し 183P-5A(N129D, T185I)、183P-5B(K160M, T216K, E235D, H296N, V520A)に分岐した。183P-5A 内でもさらに D187A, Q189E 群と、抗原性部位の置換である N156K 群が確認された。NA タンパク質に H275Y 置換を有するオセルタミビル耐性株は散発的に検出されているが、耐性株の流行は確認されていない。なお 2020/21 シーズンには 2 株のみ解析され、いずれも 183P-5A 内 D187A, Q189E 群に属した。
A(H3N2)ウイルス：2017/18 シーズンはほとんどの流行株が HA 遺伝子系統樹上の 3C.2a（代表株：A/Hong Kong/4801/2014）に属し、さらに 3C.2a1（N171K+I406V+G484E、代表株：A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016）、3C.2a2（T131K+R142K+R261Q）、3C.2a3（N121K+T135K+S144K）のサブクレードに分岐していた。また、一部の株が 3C.3a（L3I+S91N+N144K+F193S+D489N）に属した。3C.2a1 内では、3C.2a1b（N121K+K92R+H311Q）にて分岐した 3C.2a1b+135K(E62G+T135K+R142G)、3C.2a1b+131K（E62G+R142G+T131K+V529I）が派生した。2019/20 には 3C.2a1b+135K 内に 137F 群

(T128A+S137F+A138S+F193S)と 198P 群 (T128A+A138S+G186D+D190N+F193S+S198P)が、 3C.2a1b+131K 内には 83E 群(K83E+Y94N+I522M)と 197R 群(Q197R+S219F+V347M)が派生した。また 83E 群には抗原性変異が示唆される 2 つの群、 F193S+Y195F+G186S+S198P 群と F193S+Y195F+Y159N+T160I+I164Q+G186D+D190N 群が 確認された。なお 2020/21 シーズンには 2 株のみ 解析され、いずれも F193S+Y195F+G186S+S198P 群 に属した。

B 型ウイルス：Yamagata 系統は、S150I, N165Y, N202S, S229D を持つクレード 3 (代表株： B/Phuket/3073/2013) に属した。Victoria 系統の分離株は、B/Brisbane/60/2008 株を代表とするサブ クレード 1A に属している。2017/18 シーズンには 1A.1 (2 アミノ酸 (162,163 位) 欠損+I180V+R498K、 代表株： B/Maryland/15/2016)、1A.2 (3 アミノ酸 (162-164 位) 欠損)、1A.3 (3 アミノ酸 (162-164 位) 欠損+K136E) が派生し 2019/20 シーズンにはほとんどの流行株が 1A.3 に属した。

D. 考察

3 シーズンの間に遺伝子変異の蓄積が進み、 A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B 型ビクトリア系統ウイルスにてそれぞれ抗原性変異を引き起こす アミノ酸置換を有する集団が派生した。ヒト血清およびフェレット血清を用いた赤血球凝集 反応試験や中和試験の結果を遺伝子解析の結果を合わせることで、流行株の変化を敏感に捉 えることが必要と考えられる。20/21 シーズンは インフルエンザウイルスの流行が極めて少な かったため、次に出現するインフルエンザウ イルスにどのような変化が現れるのか流行がど のようになるのか、今後も継続した監視が必要 である。

E. 結論

A(H1N1)pdm09 ウイルス、A(H3N2)ウイルス、B 型 Victoria 系統ウイルスの遺伝子に変異が蓄積 し抗原性変異群も存在するため、次流行へ向け

でのウイルスの監視が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takayama I, Nguyen BG, Dao CX, Pham TT, Dang TQ, Truong PT, Do TV, Pham TTP, [Fujiisaki S](#), Odagiri T, Hasegawa H, Nakajima N. Next-Generation Sequencing Analysis of the Within-Host Genetic Diversity of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses in the Upper and Lower Respiratory Tracts of Patients with Severe Influenza. *mSphere*. 2021 1, 6(1), e01043-20.
- Huddleston J, Barnes JR, Rowe T, Xu X, Kondor R, Wentworth DE, Whittaker L, Ermetal B, Daniels RS, McCauley JW, [Fujiisaki S](#), Nakamura K, Kishida N, Watanabe S, Hasegawa H, Barr I, Subbarao K, Barrat-Charlaix P, Neher RA, Bedford T. Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. *Elife*. 2020 9, 9, e60067
- Takashita E, Abe T, Morita H, Nagata S, [Fujiisaki S](#), Miura H, Shirakura M, Kishida N, Nakamura K, Kuwahara T, Mitamura K, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Influenza Virus Surveillance Group of Japan, Influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a PA E23K substitution detected from a child without baloxavir treatment. *Antiviral Res*. 2020 8, 180, 104828
- Harada N, Shibata W, Koh H, Takashita E, [Fujiisaki S](#), Okamura H, Nanno S, Yamada K, Nakamae H, Hino M, Kakeya H. Successful treatment with baloxavir marboxil of a patient with peramivir-resistant influenza A/H3N2 with a dual E119D/R292K substitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a case report. *BMC Infect Dis*. 2020 7, 20(1), 478
- Takashita E, Ichikawa M, Morita H, Ogawa R, [Fujiisaki S](#), Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Sugawara H, Sato A,

- Akimoto M, Mitamura K, Abe T, Yamazaki M, Watanabe S, Hasegawa H, Odagiri T. Human-to-Human Transmission of Influenza A(H3N2) Virus with Reduced Susceptibility to Baloxavir, Japan, February 2019. *Emerg Infect Dis.* 2019, 11, 25(11), 2108-2111
- Nakauchi M, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Ogawa R, Morita H, Miura H, Saito S, Watanabe S, Odagiri T, Kageyama T. Rapid detection of an I38T amino acid substitution in influenza polymerase acidic subunit associated with reduced susceptibility to baloxavir marboxil. *Influenza Other Respir Viruses.* 2020 ,2 doi: 10.1111/irv.12728
 - Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, Gregory V, Gubareva LV, Huang W, Hurt AC, Lackenby A, Nguyen HT, Pereyaslov D, Roe M, Samaan M, Subbarao K, Tse H, Wang D, Yen HL, Zhang W, Meijer A. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017-2018. *Antiviral Res.* 2020, 3, 175 , 104718
 - Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ota A, Togashi H, Saito A, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T. Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment, Japan, January 2019. *Euro Surveill.* 2019 Mar;24(12).
 - Kawakami C, Yamayoshi S, Akimoto M, Nakamura K, Miura H, Fujisaki S, Pattinson DJ, Shimizu K, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Yasuhara A, Usuku S, Okubo I, Toyozawa T, Sugita S, Smith DJ, Watanabe S, Kawaoka Y. Genetic and antigenic characterisation of influenza A(H3N2) viruses isolated in Yokohama during the 2016/17 and 2017/18 influenza seasons. *Euro Surveill.* 2019 Feb;24(6).
 - Takashita E, Kawakami C, Morita H, Ogawa R, Fujisaki S, Shirakura M, Miura H, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Mitamura K, Abe T, Ichikawa M, Yamazaki M, Watanabe S, Odagiri T, On Behalf Of The Influenza Virus Surveillance Group Of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018. *Euro Surveill.* 2019 Jan;24(3).
 - Yoshihara K, Le MN, Toizumi M, Nguyen HA, Vo HM, Odagiri T, Fujisaki S, Ariyoshi K, Moriuchi H, Hashizume M, Dang DA, Yoshida LM. Influenza B associated paediatric acute respiratory infection hospitalization in central vietnam. *Influenza Other Respir Viruses.* 2018 Dec 21.
 - Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, Kuwahara T, Kishida N, Watanabe S, Odagiri T. Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil. *Front Microbiol.* 2018 Dec 6;9:3026.
 - Kuwahara T, Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Takahashi H, Suzuki N, Kawaoka Y, Watanabe S, Odagiri T. Isolation of an Egg-Adapted Influenza A(H3N2) Virus without Amino Acid Substitutions at the Antigenic Sites of Its Hemagglutinin. *Jpn J Infect Dis.* 2018 May24;71(3):234-238.doi:10.7883/yoken.JJID.2017.551. Epub 2018 Apr 27.
2. 学会発表
- 中内 美名、高下 恵美、藤崎 誠一郎、白倉 雅之、齊藤 慎二、渡邊 真治、小田切 孝人、影山 努 I38T 変異の迅速検出法 第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京

- ・ 中村 一哉、秋元 未来、藤崎 誠一郎、白倉 雅之、三浦 秀佳、岸田 典子、佐藤 彩、桑原 朋子、高下 恵美、長谷川 秀樹、小田切 孝人、渡邊 真治 フォーカス減数試験改良法によるインフルエンザ A/H3N2 亜型分離株抗原性解析の精度改善 第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京
- ・ 渡邊 真治、中村 一哉、岸田 典子、藤崎 誠一郎、白倉 雅之、高下 恵美、桑原 朋子、佐藤 彩、秋元 未来、三浦 秀佳、小川 理恵、森田 博子、菅原 裕美、小田切 孝人、長谷川 秀樹、インフルエンザ株 サーベイランスグループ 2018/19 シーズンにおけるインフルエンザ流行株の性状と 2019/20 シーズンのワクチン株選定について 第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京
- ・ 高下 恵美、森田 博子、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、三田村 敬子、安倍 隆、市川 正孝、山崎 雅彦、渡邊 真治、小田切 孝人、長谷川 秀樹、全国 地方衛生研究所 バロキサビル耐性変異インフルエンザ A(H3N2) ウイルスのヒトーヒト感染 第 67 回日本ウイルス学会学術集会、2019 年 10 月、東京
- ・ Characterizations of circulating influenza viruses in the 2017/18 season and selection of vaccine viruses for the 2018/19 season Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichiro Fujisaki, Masayuki Shirakura, Emi Takashita, Tomoko Kuwahara, Noriko Kishida, Aya Sato, Miki Akimoto, Hideka, Miura, Rie Ogawa, Hiromi Sugawara, Kayo Watanabe, Hiroko Morita, Keiko Mitamura, Takashi Abe, Masataka Ichikawa, Masahiko Yamazaki, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018
- ・ In vitro characterization of multi drug-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses carrying a dual amino acid substitution associated with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors Emi Takashita, Seiichiro Fujisaki, Masaru Yokoyama, Masayuki Shirakura, Kazuya Nakamura, Tomoko Kuwahara, Noriko Kishida, Hironori Sato, Shinji Watanabe, Takato Odagiri, The Influenza Virus Surveillance Group of Japan 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018
- ・ Analysis of genetic dynamics of influenza A(H1N1)pdm09 viruses in upper and lower respiratory tracts using next-generation sequencing. Ikuyo Takayama, Nguyen Gia Binh, Vu Thi Tuong Van, Truong Thai Phuong, Thanh Do Van, Pham Thi Phuong Thuy, Seiichiro Fujisaki, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama, Noriko Nakajima 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

