

〔調査研究〕

Genetic microheterogeneity of emerging H275Y influenza virus A(H1N1)pdm09 in Saga, Japan from the 2017-2018 influenza season.

ウイルス課 安藤克幸 島あかり 諸石早苗

アメリカやメキシコなど北米を中心に 2009 年 4 月よりブタ由来の新型インフルエンザウイルス(AH1pdm09)が発生し、感染が瞬く間に世界中に拡大した 1)。

その後、世界各国で分離されたこの AH1pdm09 株の大半は、Neuraminidase (NA) 阻害薬のオセルタミビルやザナミビルに感受性を示すが、国内で検出された AH1pdm09 株から散発的にオセルタミビル耐性を獲得したウイルスが確認されている 2)。

そして、異なる作用機序の M2 タンパク質を標的とする M2 阻害薬のアマンタジンやリマンタジンに対しては、現在ではほとんどの AH1pdm09 株が耐性を獲得している。

過去、県内では AH1pdm09 による主な流行は 2009/2010, 2010/2011, 2013/2014 及び 2015/2016 シーズンに発生している。

このうち、特に 2009 年の流行時には、若年から低年齢層において高頻度にウイルス性の肺炎を発症している。

このことが関連するのかわからないが、国内では諸外国に比較して、突出してオセルタミビル(商品名:タミフル)を大量に使用してきている。このため国立感染症研究所を中心に薬剤耐性インフルエンザウイルスのスクリーニング調査がこれまで行われている。

今回、県内で初めて 抗インフルエンザ薬投与前の小児患者から薬剤耐性インフルエンザウイルスが検出されたため、詳細について調査することとした。

1 材 料

2017 年 9 月～2018 年 3 月に県内の感染症発生動向調査病原体定点医療機関を受診し、この調査に同意された患者から採取した臨床検体(鼻・咽頭拭い液、うがい液)を材料とした。

そして、ウイルス分離及び RT-PCR 法 3)により AH1pdm09 と同定された検体(臨床検体・分離ウイルス)について詳細な解析を行った。

2 方 法

(1)ウイルス分離

既報の方法 3)に基づき臨床検体を MDCK 細胞に接種し、トリプシン加 D-MEM、5%CO₂、34°C で 7 日間培養した。インフルエンザウイルス分離用の MDCK 細胞は 20 代以内の継代歴のものを使用した。また、必要に応じてプラーククロニング 4)を実施した。

(2)NA 遺伝子解析

オセルタミビル耐性ウイルスの検出は、NA 遺伝子を対象とし、allelic discrimination の原理による Allele-specific RT-PCR 法 5)を用いた H275Y 耐性変異のスクリーニングにより実施した。

変異遺伝子の検出には、分離株および臨床検体から抽出した RNA を用い、スクリーニング陽性株の NA 遺伝子の部分シーケンスを行った。RT-PCR では、増幅した遺伝子の 825 番目の CAC ⇒ TAC

〔調査研究〕

置換、アミノ酸変換後で 275 番目のアミノ酸がヒスチジン(H)からチロシン(Y)に置換(H275Y)していることを確認した。

NA 遺伝子全領域の解析には、以下の primer sets による Long PCR を行った。

swine N1-F1 ;AGCAAAGCAGGAGTTCAAATGA

swine N1-959-941R ;CCACTGCATATGTATCCTA

swine N1-676-694F ;ACACAAGAGTCTGAATGTG

swine N1-R1 ;GTAGAAACAAGGAGTTTTTTGAAC

シーケンス反応は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit により行い、MEGA6、GISAID database および Influenza Research Database で解析した。

(3) 薬剤感受性試験

Allele-specific RT-PCR 法と部分シーケンスで検出した H275Y 耐性変異株について、NA 阻害薬のオセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルに対する感受性試験を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で実施した。感受性試験は NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit (Applied Biosystems) を用いた化学発光法により行った。H275Y 耐性参照株として A/PERTH/261/2009 を使用し、感受性参照株には A/PERTH/265/2009 を使用した。薬剤解析株の感受性は、定法によりウイルスの NA 活性を 50% 阻害する薬剤濃度 (IC50 値) により比較、実施した。

(4) 抗原性解析および HA 遺伝子解析

MDCK 細胞による培養で細胞変性効果がみとめられたウェルの培養上清は、0.5%ニワトリ赤血球を用いて赤血球凝集 (HA) 試験を行った。

分離株の抗原解析は、国立感染症研究所より分与された抗 A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180) (H1N1)pdm09 血清、抗 A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) 血清、抗 B/Texas/2/2013 (ビクトリア系統) 血清および抗 B/Phuket/3073/2013 (山形系統) 血清を用いた赤血球凝集抑制 (HI) 試験により行った。

HA 遺伝子全領域の解析は、以下の primer sets による PCR 及び Long PCR により行った。

H1HA1-BEGIN ;AGCAAAGCAGGGGAAAATAA

swine H1-568-545R ;AATGTAGGATTTTCTGAKCTTTGG

swine H1-366-385F ;GAGCTCAGTGTCATCATTTG

swine H1-1106-1087R ;TGATAACCGTACCATCCATC

swine H1-1013-1034F ;TCCCGTCTATTCAATCTAGAGG

HA2H1-1759-1778R ;AGTAGAAACAAGGGTGTTTTT

シーケンス反応は、NA 遺伝子と同様に行い、GISAID database および Influenza Research Database で解析した。

3 結果

(1) ウイルス分離

MDCK 細胞による分離は、継代培養 1 回目又は 2 回目の培養液を RT-PCR 法 3) で検査することにより AH1pdm09 ウイルスを確認した。

〔調査研究〕

(2)NA 遺伝子解析

RT-PCR 法により AH1pdm09 ウイルスが陽性であった検体について、Allele-specific RT-PCR 法実施したところ A/Saga/307/2017 がオセルタミビル耐性であった。

そして、NA 遺伝子の部分シーケンスを行った結果、増幅遺伝子の 825 番目の塩基が CAC ⇒ TAC に置換していた。(図 1)

この Allele-specific RT-PCR 法と部分シーケンスにより H275Y 耐性変異が認められた A/Saga/307/2017 は 2017 年 12 月に検体採取され、分離した株であった。

また、A/Saga/307/2017 分離株(臨床検体)は、部分シーケンス法による解析で、以下のとおり耐性株(H275Y)のみの単一波形であった。(図 1)

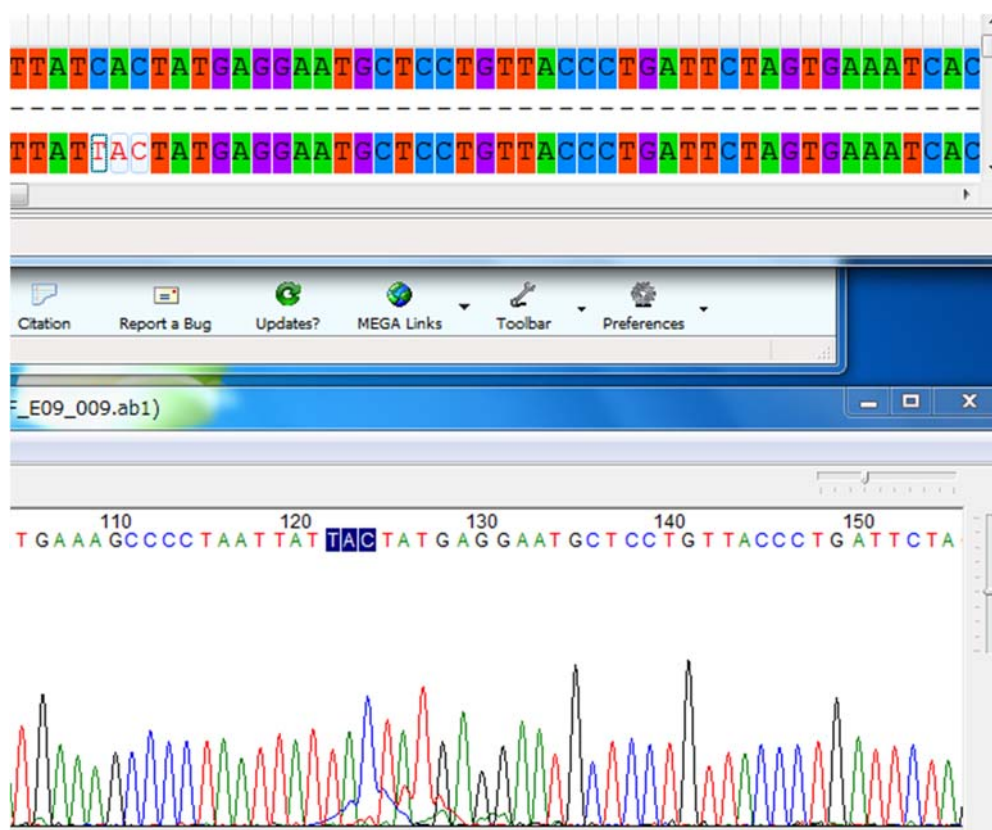


図 1 A/Saga/307/2017 株の部分シーケンス(H275Y)

〔調査研究〕

さらに、NA 遺伝子の全領域を解析した結果、臨床検体、分離ウイルスは、以下のとおり同一配列であった。(分離株解析結果のみ掲載) 図 2

GenBank - Send to: Change region shown Customize view

Influenza A virus (A/Saga/307/2017(H1N1)) NA gene for neuraminidase, complete cds

GenBank: LC376821.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to](#) [Go to](#)

LOCUS LC376821 1418 bp cRNA Linear VRL 18-APR-2018
 DEFINITION Influenza A virus (A/Saga/307/2017(H1N1)) NA gene for neuraminidase, complete cds.
 ACCESSION LC376821
 VERSION LC376821.1
 KEYWORDS -
 SOURCE Influenza A virus
 ORGANISM Influenza A virus
 Viruses; ssRNA viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae; Alphainfluenzavirus.

REFERENCE 1
 AUTHORS Ando, K. and Shimo, A.
 TITLE pds09 H275Y
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1418)
 AUTHORS Ando, K. and Shimo, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-PMR-2018) Contact: Katsuyuki Ando Saga Prefectural Institute of Public Health and Pharmaceutical Research; 1-20 Hachonawatenachi, Saga, Saga 849-8925, Japan

FEATURES
 location/Qualifiers
 source 1..1418
 /organism="Influenza A virus"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/Saga/307/2017"
 /serotype="H1N1"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:11328"
 /segment="6"
 /country="Japan: Saga"
 /collection_date="2017-12-13"
 /note="A(H1N1)pds09"

gene

CD5

ORIGIN
 1 atgaaatccaa accaaaagat aataaccatt ggttcgatc gtatgcaat tggaaagct
 61 aacttaatat tacaattgg aacaataatc tcaatattgg ttaccactc aattcaaat
 121 ggaatcaaaa gccagattga aacatgcaat caaagctca ttacttatga aaacaacact
 181 tgggtaaatc agacatattg taacatcagc aacaccaact tggctgtag acagtcaag
 241 gcttccatga aattagcagg caattcctct ctctgcctg ttagtggatg ggcataatac
 301 agtaaaagca acagtgtaag aatgcttcc aaggggatg ttgtttgcat aagggaaaca
 361 ttcatatcat gctctccctt ggaatgcaga accttctct tgaactcaag gctttgta
 421 aatgcaaac attcctaatg aacatataa gacagagcc catatcgaac cctaatgagc
 481 tgtcctattg gtaagttcc ctctccatc aactcaagat ttgagtcagt cgtttgta
 541 caagatgctt gtaatgtag caacatagg ctaacaatg gaattctgg cccagacagt
 601 ggggtagtgg ctgtgttaa atacaatggc ataatcaag acctatcaa gagttggagg
 661 aacatataat tggagacaca agagcttga ttgttatgtg taatggctt ttgtttacc
 721 ataatgaccg atgaccagg tgaaggcag gctctatca aactttcag aatgapaag
 781 ggaagataaa tcaatcagt tgaatgaaa gcccataat attactatga ggaatgctc
 841 tttaccctg attctatga aatcaatgt gttgcaagg ataatggca tggctgaa
 901 cgaccgagg tgtcttcaa ccagaatctg gaatataca tggatacat atgagtagg
 961 gttttggag acaatccag cctaatgtt aagacaggc gttggttcc agtatgct
 1021 aatggaaca atggaataa aggatttca tcaaatagc gcaatgggt ttgatagg
 1081 agaataga gcaatgctt aapaaaagt ttgataga ttggatccc gaatgata
 1141 actggactg acaataaatt ctcaataag caagatagc taggaataa tgaatgta
 1201 ggttatagc ggaatttgt tcagatcca gaactaacag gcttgattg taatagact
 1261 tgttctggg ttgaactat aagagacga ccgaagaga acaaatctg gactagcgg
 1321 agcagcatat ctttttggg ttgagcagt gaacttag gttggttgg gccagaggt
 1381 gctgagttc catttaccat tgaagaata

図 2 A/Saga/307/2017 株の NA 遺伝子全領域解析結果

(3) H275Y 耐性変異株の NA 阻害薬に対する感受性試験

感受性参照株として用いた A/PERTH/265/2009 のオセルタミビル、ペラミビル、ザナミビルおよびラニナミビルに対する IC₅₀ 値は 0.29nM、0.05 nM、0.11 nM および 0.16nM であった。一方、県内で分離した A/Saga/307/2017 の IC₅₀ 値はそれぞれ 384.92nM、18.44nM、0.22nM および 0.95nM で、感受性参照株と比較してオセルタミビルに対して約 1,327 倍、ペラミビルに対して約 369 倍感受性が低下してい

〔調査研究〕

たが、ザナミビルおよびラニナミビルに対しては感受性を保持していた。

(4) オセルタミビル耐性 AH1pdm09 ウイルスの抗原性解析および HA 遺伝子解析

県内で分離したオセルタミビル、ペラミビル耐性 AH1pdm09 (A/Saga/307/2017) は、抗 A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180) (H1N1)pdm09 血清(ホモ価 1,280)に対して HI 価 640 であり、抗原性は Michigan/45/2015 や 2010/11~2015/16 シーズンの AH1pdm09 ワクチン株 A/California/7/2009 に類似していた。一方、抗 A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) 血清(同 5,120)、抗 B/Texas/2/2013 (Victoria 系統)血清(同 640)および抗 B/Phuket/3073/2013 (山形系統)血清(同 1,280)に対しては、HI 価は 10 未満であった。

また、A/Saga/307/2017 の HA 遺伝子の全領域を解析した結果、臨床検体、分離株は、以下のとおり同一配列であった。(分離株解析結果のみ掲載) 図 3 系統樹解析 図 4

〔調査研究〕

GenBank > Send to >

Influenza A virus (A/Saga/307/2017(H1N1)) HA gene for hemagglutinin, complete cds

GenBank: LC376820.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to >](#)

LOCUS LC376820 1781 bp cRNA linear VRL 18-APR-2018
 DEFINITION Influenza A virus (A/Saga/307/2017(H1N1)) HA gene for hemagglutinin, complete cds.

ACCESSION LC376820
 VERSION LC376820.1
 KEYWORDS .

SOURCE Influenza A virus
 ORGANISM Influenza A virus
 Viruses; ssRNA viruses; ssRNA negative-strand viruses; Orthomyxoviridae; Alphainfluenzavirus.

REFERENCE 1
 AUTHORS Ando, K. and Shima, A.
 TITLE pdn09_H275Y
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1781)
 AUTHORS Ando, K. and Shima, A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-MAR-2018) Contact: Katsuyuki Ando Saga Prefectural Institute of Public Health and Pharmaceutical Research; 1-20 Macchonawatenachi, Saga, Saga 849-0925, Japan
 Location/Qualifiers

FEATURES
 source 1..1781
 /organism="Influenza A virus"
 /mol_type="viral cRNA"
 /strain="A/Saga/307/2017"
 /serotype="H1N1"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:113328"
 /segment="4"
 /country="Japan: Saga"
 /collection_date="2017-12-13"
 /note="A(H1N1) pdn09"

gene 1..1781
 /gene="HA"

cds 1..1781
 /gene="HA"
 /codon_start=1
 /product="hemagglutinin"
 /protein_id="BB034715_1"
 /translation="MKVLLVLLVYFTTANADLCIGYHANNSTDTVTVLEKNVTVT
 HSNLLERDHHGKLLKLRDVAFLHGLKCNLAGLGNPECELSLARNSYIVETSNS
 DNGTCYQDFDNYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPHDSNKGVTAACPHAGAKS
 FYKLLDLVKKGNQYPKISKYSINDKQKVELVLMGIDHHPSTADQQLVQNDAYVYV
 GTSRYRKKFKPELATRPKYKVDQGRMNYWTLVPEGDKITFEATQNLVPRYAFIMER
 NAGSGLIISDTPHDCNTTCQTPGALNLSLFPQNHPIIGKCPKYVKSTKLRLATG
 LRHWPSIQSRGLFGALAGFIEGGWTQVQGWYDHHQNEQCSGYAADLKSTQNAIDKI
 TRKNSVIEKHTQFTAVGKEFNHLKRPENLKKVDDGFLDINTYNAELVLLENER
 TLDYHDSMNKLVKRVNQLKNNAKEIQMGCFEYHKDNTQESVWNGTYDYPKYS
 EAKLNREKIDQVLESTRIVQILAIYSTVASSLVVLSGALSFWKSNGLQKRLCI
 "

ORIGIN
 1 atgaaggtaa tactagtagt tctgctgtat acatttcaa ccgcaaatgc agacacatta
 61 tgtataggtt atcatcgaa caatttcaaa gacactgtag acacagctact agagaagaat
 121 gtaacagtaa cacactctgt taacttcttg gaagcaagc ataacggaaa actatgcaaa
 181 ctaagagggg tagccctatt gcaattgggt aaatgtaaca ttgctgctg gatcctggga
 241 aatccagagt gtgaatcact ctccacagca agatcattgt cctacattg ggaacatct
 301 aatccagaga atggaacgtg ttaccagga gatttcatca attatgaga gctaaagag
 361 caattgagct cagtgtcacc attgaaagg ttgaaatatt tcccagaac aagtcatgg
 421 cctaatcagc actgaaacaa agtgttaac gcagcattgc ctacagctgg agcaaaaagc
 481 ttctacaaa acttgatag gctggttaaa aaaggaatt cataccaaa gatcagcaa
 541 tctacatta atgataaagg gaagaagtc ctgctgctg ggggcattca ccatccatct
 601 actactgctg accaacaag tctctatcag aatgcagatg catatgttt ttgtgggaca
 661 tcaagatacc gcaagaatt caagcggaa atagcaaca gaccacaagt gaggatcaa
 721 gaaggagaa tgaactatta ctggacata gttagcagg gagacaaaat aacattcgaa
 781 gcaactgaa atctagtagt accagatat gcaattcaaa tggaaagaaa tctggatct
 841 ggtattatca tttagatac accagtcaac gattgcaata caactgtca gacaccgag
 901 ggtgctataa accacagct cccatttcaag aatgtacatc gattcaaat tggaaatgt
 961 caaagtatg taanaagcac aaattgaga ctgaccacag gattgagaa tgtcccgtct
 1021 attcaatcct aggcctatt cgggccatt gccgcttca ttgaagggg gtgacaggg
 1081 atggtagatg gatgtagc ttatcaccat caaatgagc aggggtcagg atatgcaacc
 1141 gatctgaa gaacacaaa tgcattgat aagattacta acaagtaaa ttctgtatt
 1201 gaagaatga atacagatt cacagcagtg ggtaaagagt tcaaccctc tgaanaaga
 1261 atggaagatc taataaaaa agttgatgat ggttctctgg acatttggac ttcaatgcc
 1321 gaactgttag ttctactgga aatgaaaga actttggact atcacgattc aatgtgaag
 1381 aactgttagt aaaaatag aaaccagta aaaaacatg ccaaggaat tggaaacgc
 1441 tctttgaat ttaccacaa atgcgataac acatgcatg aaagtgtca gaatgggact
 1501 tatgactacc caaatactc agagaagca aaattaaaca gagaanaaat agatgggata
 1561 aagctggaa caacaagat ctaccagatt ttggcattc attcaactgt cgccagtca
 1621 ttggtactgg tagtctcctc ggggcaatc agctcttggg tgtgctctaa tgggtctca
 1681 cagttagaa tatgtattta a

//

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Influenza Virus Resource

Retrieve, view, and download influenza virus genomic and protein sequences.

Related information

Taxonomy

Functional Class

LinkOut to external resources

Influenza Research Database
[Influenza Research Database]

Order HA cDNA clone/Protein/Antibody/RNA
[OrfGene]

Recent activity

[View All](#) [Clear](#)

Influenza A virus (A/Saga/307/2017(H1N1))
 HA gene for hemagglutinin, complete Nucleotide

Influenza A virus (A/Saga/307/2017(H1N1))
 NA gene for neuraminidase, complete Nucleotide

LC376820 (0) Published

Application of adipose-derived stem cells in heart disease. Published

[See more...](#)

図 3 A/Saga/307/2017 株の HA 遺伝子全領域解析結果

〔調査研究〕

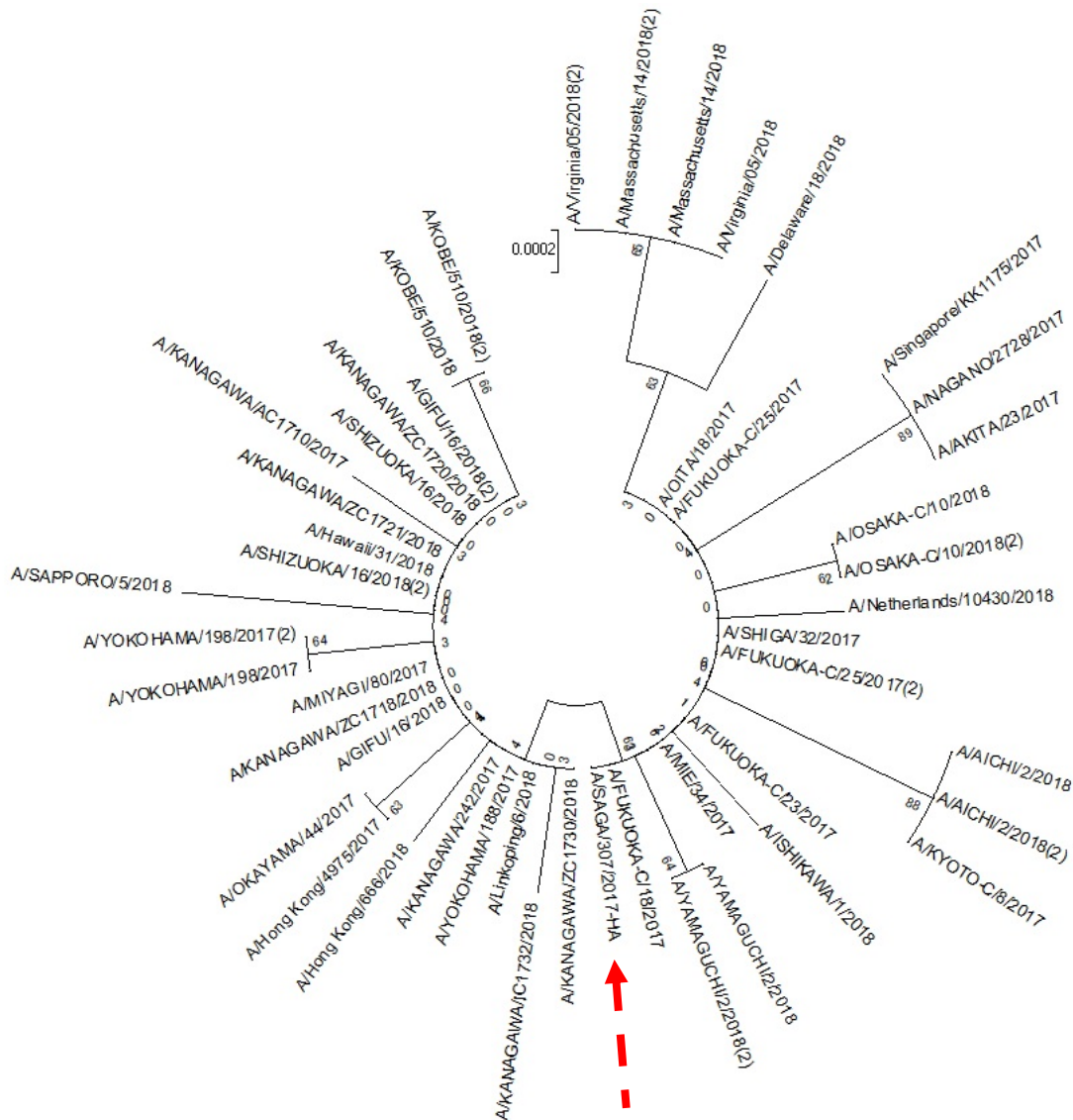


図 4 A/Saga/307/2017 HA 遺伝子 系統樹解析

4 考 察

(1) ウイルス分離

2017/18 インフルエンザシーズンのインフルエンザウイルス検体数は 161 株で A/H1pdm09 の比率は、25.5%であった。

採取検体の年齢群別内訳は、0～1 歳群 1 名(0.02%)、1～2 歳群 2 名(0.05%)、2～3 歳群 2 名(0.05%)、3～4 歳群 5 名(0.12%)、4～5 歳群 6 名(0.15%)、5～10 歳群 14 名(0.34%)、10～15 歳群 5 名(0.12%)、15～20 歳群 1 名(0.02%)、20 歳を越える群 5 名(0.12%)であった。

また、A/H1pdm09 株が検出されたのは 2017 年第 46 週から 2018 年第 9 週で、流行のピークは 2017 年第 47 週から第 50 週であった。

(2) NA 遺伝子解析、H275Y 耐性変異株の NA 阻害薬に対する薬剤感受性試験

日本国内で検出された耐性ウイルスはいずれも NA 蛋白に H275Y 耐性変異をもち、オセルタミビル(商

〔調査研究〕

品名タミフル)およびペラミビル(商品名ラピアクタ)に耐性を示す一方で、ザナミビル(商品名リレンザ)およびラニナミビル(商品名イナビル)に対しては感受性を保持していた。しかし 2014 年4月に、日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスにおいて初めて H275Y 耐性変異に加えて I223R 耐性変異をもち、オセルタミビルおよびペラミビルに高い耐性を示し、さらにザナミビルおよびラニナミビルに対しても感受性が低下した A(H1N1)pdm09 ウイルスが広島県で検出されている。

単独で I223R 耐性変異をもつ A(H1N1)pdm09 ウイルスは、これまでに NA 阻害剤投与例から検出されており、I223R 耐性変異は NA 蛋白の活性部位のコンホメーションを縮小変化させることで NA 阻害剤との結合力を低下させ、オセルタミビル、ペラミビルおよびザナミビルに対して感受性の低下を示すことが報告されている(6-8)。

2009 年に、世界で初めて、米国ペンシルバニア州で検出された H275Y/I223R の二重耐性変異をもつ A(H1N1)pdm09 ウイルスは、感受性株に比べてオセルタミビルに対して 9,053 倍、ペラミビルに対して 13,092 倍、ザナミビルに対しても 22 倍感受性が低下していた(9)。

また、NA 蛋白の V241I、N369K および N386S の3つの変異が H275Y 変異ウイルスの安定化に寄与することが報告されている(10)が、A/Saga/307/2017 株でも 241 番目のアミノ酸がバリン(V)からイソロイシン(I)に、369 番目のアミノ酸がアスパラギン(N)からリシン(K)に、386 番目のアミノ酸がアスパラギン(N)からセリン(S)に変異していた。

さらに、F74L、G77R、V81A、I188T、A232V 及び N449D の各変異が確認された。(図 5)

〔調査研究〕

Reference: NA_H1N1_Human_2015_Michigan45 ([Structure/Model Details](#))
 Patient/Sample: LC376821.1 Influenza A virus (A/Saga/307/2017(H1N1)) NA gene
 Mutation(s): F74L, G77R, V81A, I188T, A232V, H275Y, N449D
 Wildtype residue only displayed if position is part of available structure.
 Hover with mouse over residue to see its position number. Right-click for more options.

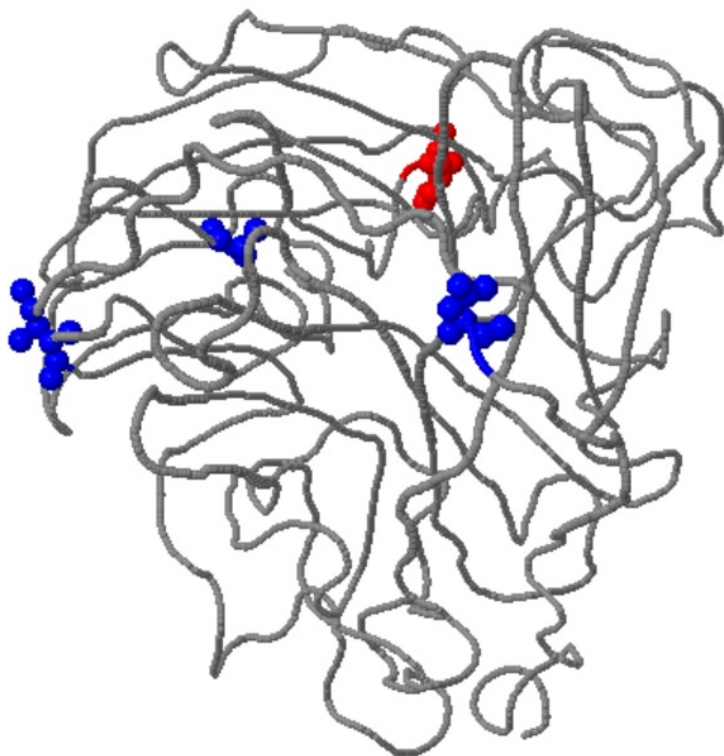


図 5 A/Saga/307/2017 NA 分子の立体構造

(3) 抗原性解析および HA 遺伝子解析

解析した分離株のすべてがワクチン株 A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180) (H1N1) pdm09 に抗原性が類似しており、A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180) (H1N1) pdm09 の抗血清に対しての HI 価は、ホモ価に比較して 4 倍以内であった。

A/Saga/307/2017 は Global swine H1 clade の 1A.3.3.2 に分類され、HA 蛋白では、N179S、S224R、R240Q、L178I、Q180K、S91R、I312V および I421M の各アミノ酸変異が確認された。図 6)

HA 抗原を 1～8 のクラスターに分類する系統樹解析では、A/Saga/307/2017 は、クレード 6B.1 (共通アミノ酸置換:S84N, S162N, I216T) 内の S74R, I295V 群に属していた。ほとんどのウイルスは S74R, I295V 群内に分岐した S164T 群に属した。さらに、S164T 群には P137S, I267T, I372L 群、L161I, I404M 群に属していた。図 6)

[調査研究]

Reference: HA_H1N1_Human_2015_Michigan45 ([Structure/Model Details](#))

Patient/Sample: A/SAGA/307/2017-HA

Mutation(s): A3V, S91R, L178I, S181T, S224R, R240Q, I312V, I421M

Wildtype residue only displayed if position is part of available structure.

Hover with mouse over residue to see its position number. Right-click for more options.

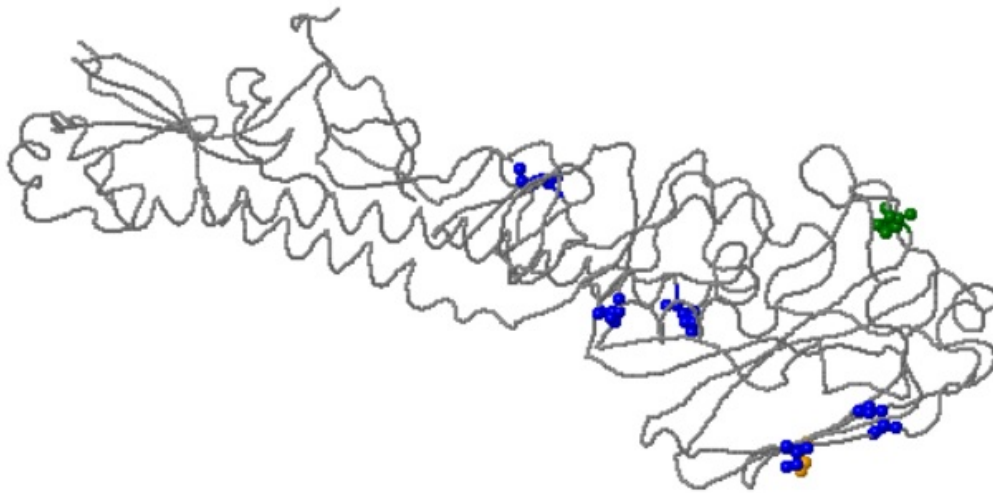
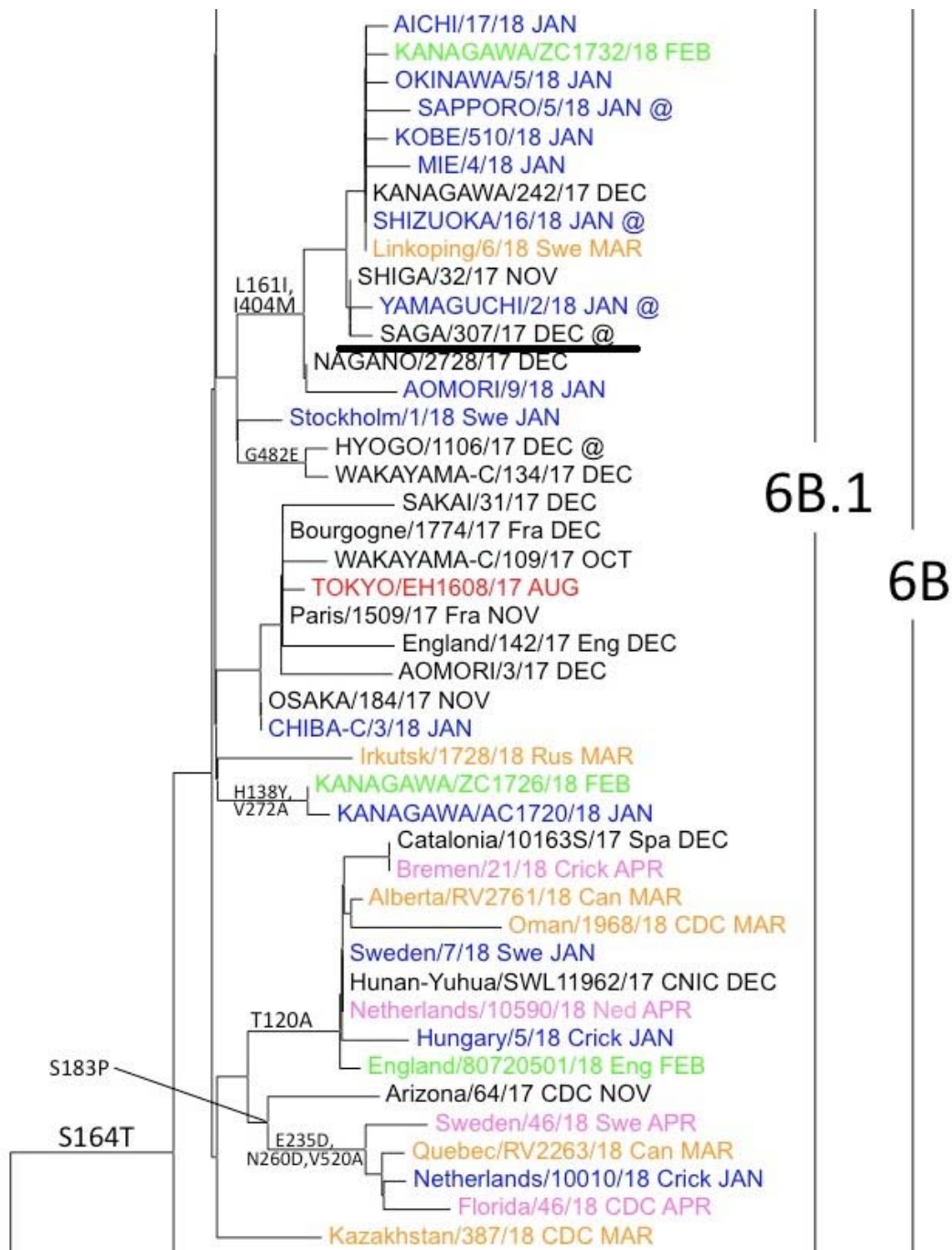


図 6 A / Saga / 307 / 2017 HA 分子の立体構造

〔調査研究〕



NIID インフルエンザ研究センター流行株抗原性解析と遺伝子系統樹 2018 06 より転載

図 7 A / Saga / 307 / 2017

(4) 抗原ミューテーションサーベイランス

インフルエンザウイルス病原性解析モデルの WSN 株のノイラミニダーゼ(NA)については、細胞表面で 456 番目の C 末端アミノ酸である Lys を主な結合部位として plasminogen と結合している。NA と plasminogen の結合には、カルボキシル末端の Lys の存在と 146 番目のアミノ酸への糖鎖付加の欠損が必要であるが、シアリダーゼ活性と関係なく、全身に分布する plasminogen の受容体として機能し、plasmin への活性化を促進して HA を開裂する 11)。

〔調査研究〕

つまり、WSN 株の病原性に関しては、NA が決定因子となっている。H5N1 が哺乳類への感染性を獲得すると考えられている HA と PB2 領域のアミノ酸変異とは異なる作用機構であり、この場合 HA が弱毒型であっても、ゲノムの 1 塩基変異で H1N1 流行株が強毒性ウイルスに変異する可能性がある。

今回検出された A/Saga/307/2017 株の NA 遺伝子 C 末端は K;リジンであり、インフルエンザウイルスの人への感染性の変異を監視するためには、薬剤耐性サーベイランスとともに HA 領域(segment4)のみならず、Segment6 についての詳細な調査が重要であると考ええる。

5 文 献

- 1) Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team : Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. N Engl J Med,2009,360,2605-2615
- 2) Takashita E, Fujisaki S, Kishida N et al : Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan . Influenza Other Respir Viruses 2013 7:1390-1399
- 3) 国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版), 2014
- 4) Nakajima S, et al : Comparison of epitope structures of H3HAs through protein modeling of influenza A virus hemagglutinin : Mechanism for selection of antigenic variants in the presence of a monoclonal antibody. Microbiol Immunol 51 (12): 1179 - 1187, 2007
- 5) Nakauchi M, et al : Rapid discrimination of oseltamivir - resistant 275Y and susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A / H1N1 2009 virus by duplex one step RT - PCR assay. J Med Virol 83 : 1121 - 1127, 2011
- 6) van der Vries E, et al., N Engl J Med 363(14): 1381-1382, 2010
- 7) Eshaghi A, et al., Emerg Infect Dis 17(8): 1472-1474, 2011
- 8) van der Vries E, et al., PLoS Pathog 7(9): e1002276, 2011
- 9) Nguyen HT, et al., Clin Infect Dis 51: 983-984, 2010
- 10) Hurt AC, et al., J Infect Dis 206: 148-157, 2012
- 11) 五藤 秀雄 ウイルス 第 54 巻 第 1 号,pp.83-91,2004

〔調査研究〕

SUMMARY

Oseltamivir is the most commonly used drug for the treatment or prophylaxis of influenza, and has been widely used in Japan.

Our nation has the highest frequency of neuraminidase (NA) inhibitor use against influenza in the world. Therefore, Japan could be at high risk of the emergence and spread of NA inhibitor-resistant viruses. The aim of this study was to monitor the emergence of NA inhibitor-resistant viruses.

To monitor antiviral-resistant A(H1N1) pandemic09(pdm09) viruses, we examined viruses isolated between September 2017 and January 2018 influenza season in Saga prefecture by allelic discrimination, NA gene sequencing, and NA inhibitor susceptibility.

We found that 1 (0.6%) of 161 seasonal influenza virus isolates possessed an H275Y substitution in the NA protein that confers about 1,327 and 369 fold decreased susceptibility to oseltamivir and peramivir, respectively, compared with 275H wild-type viruses.

The HI test was performed to estimate the reactivity of A(H1N1)pdm09 virus to ferret antiserum against the 2017–18 vaccine strain A/California/7/2009.

Most of A (H1N1)pdm09 (n = 41) isolates were inhibited by anti-A/California/7/2009 ferret antiserum, and oseltamivir-resistant (n = 1) A(H1N1)pdm09, respectively, showed a 4-fold reduced HI titer.

Phylogenetic trees of NA and HA genes were constructed by neighbor-joining method. A phylogenetic tree was constructed by using representative A (H1N1)pdm09 isolates from several prefectures of Japan. Sequence information of A(H1N1)pdm09 from other countries was downloaded from the Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) and GenBank.

Genetical analysis of A/SAGA/307/2017 which was predicted that neuraminidase substitutions V241I, N369K, and N386S in the virus may offset the destabilizing effect of the H275Y substitution.

The phylogenetic analysis of A/SAGA/307/2017 HA gene belong to the 6B.1 genetic group, presenting AA changes in the HA at residue ,S224R,R240Q,L178I,Q180K, S91R,I312V and I421M in the HA1 and HA2 region.