

論文の内容の要旨

論文題目：Characterization of currently circulating influenza B viruses

(B 型インフルエンザウイルス流行株の性状解析)

氏名：加藤（宮下） 紗理

【背景と目的】

インフルエンザは、インフルエンザウイルス感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症である。インフルエンザウイルスは、そのウイルス粒子内部のマトリックス蛋白質(M1)と核蛋白質(NP)の抗原性の違いに基づいて、A、B、C、Dの4つの型に分類される。それらの中で毎年冬季に流行し、乳幼児や高齢者を中心に健康被害をもたらすのは、A型およびB型インフルエンザウイルスである。世界では毎年、小児人口の20~30%が、成人人口の5~10%が季節性インフルエンザに罹患し、その中で300~500万人が重症化し、29~65万人が死亡していると推定されている (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>)。

A型インフルエンザウイルスは、その粒子表面に存在する糖蛋白質[ヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)]の抗原性の違いにより亜型に分類される。一方、B型インフルエンザウイルスは亜型の存在は確認されていないが、そのHAの抗原性の違いにより、2つの系統(山形系統とVictoria系統)に分類される。2019年現在、2009年に世界的大流行を引き起こしたウイルス(A/H1N1pdm09)、A/H3N2、B型の山形系統とVictoria系統の4種類が、季節性インフルエンザウイルスとして流行している。

インフルエンザウイルスの感染防御抗原であるHAに変異が蓄積していくと、ヒト集団が過去の感染やワクチン接種によって獲得した免疫から逃れる抗原変異株が出現し、新たな流行を引き起こす。一方、季節性インフルエンザの治療には、NAを標的とする薬剤(NA阻害剤)が使用されているが、NAに変異が生じるとNA阻害剤に耐性を示す株が出現し、蔓延する可能性がある。季節性インフルエンザの流行を制御するには、毎冬流行するウイルスの抗原性状や抗インフルエンザ薬に対する感受性を分析して、その性状変化を迅速に把握することが重要である。

2017/18インフルエンザシーズンは、A/H1pdm09、A/H3、B型インフルエンザウイルスの混合流行であった。しかし、国内において分離・検出されたB型インフルエンザウイルス株数は、総分離数の約4割を占めるなど、同シーズンのB型インフルエンザの流行は過去10シーズンにおいて最も大きなものだった

(<https://nesid4g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data95j.pdf>)。一方、2018/19 シーズンは前シーズンと同様に A/H1pdm09、A/H3、B 型インフルエンザウイルスの混合流行であったが、同シーズンの B 型インフルエンザウイルスの流行は、前シーズンと比較すると小規模の流行に留まった。本研究では、2017/18 と 2018/19 シーズンに日本国内において流行した B 型インフルエンザウイルスの性状を把握することを目的として、この 2 シーズンに国内で分離された B 型インフルエンザウイルスの抗原性状並びに遺伝学的性状を調べた。

【材料と方法】

当研究室は、2017/18 と 2018/19 インフルエンザシーズンに東京都内の医療機関を来院したインフルエンザ様疾患患者から採取された 554 の呼吸器検体を入手して、検体中のウイルス遺伝子を解析した。その結果、554 検体中 108 検体が B 型インフルエンザウイルス陽性 [2017/18 シーズン：97 検体、2018/19 シーズン：11 検体]であることがわかった。この 108 検体から MDCK 細胞、AX4 (ヒト型レセプター高発現 MDCK) もしくは hCK (ヒト型レセプター高発現/鳥型レセプター低発現 MDCK) 細胞を用いて B 型インフルエンザウイルスを分離した。2017/18 シーズンに分離された 97 株中 95 株(97.9%)が B/山形系統に属し、残りの 2 株(2.1%) が B/Victoria 系統に属した。一方、2018/19 シーズンに分離された 11 株については 2 株が B/山形系統に、9 株が B/Victoria 系統に分類された。本研究では、2017/18 シーズンに分離された 62 株 (B/山形系統の 60 株と B/Victoria 系統の 2 株) と 2018/19 シーズンの 6 株 (B/山形系統の 1 株と B/Victoria 系統の 5 株) について詳細な解析を行った。

遺伝子解析：分離株の HA 遺伝子の塩基配列を決定し、既知の配列と比較して、系統樹を作成した。抗原解析：B 型インフルエンザウイルスのワクチン株とワクチン株に遺伝的に類似した株に対するフェレット感染血清を用いて、赤血球凝集阻止 (HI) 試験を行った。NA 阻害剤に対する感受性解析：ウイルスに対する NA 阻害剤 (オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビル) の IC₅₀ 値(ウイルスの NA 活性を 50%阻害する薬剤濃度)を算出した。

【結果と考察】

最近の B/山形系統流行株は、HA 遺伝子系統樹において、2 つのクレード(クレード 2、3) に分類される。解析した B/山形系統の 61 株全てが 2017/18 と 2018/19 シーズンに使用された B/山形系統ワクチン株 B/Phuket/3073/2013 に代表されるクレード 3 に属した。B/山形系統 61 株のうち 11 株について、3 種類のフェレット感染血清を用いた HI 試験により抗原解析を行った。11 株に対する B/Phuket/3073/2013 フェレット感染血清の HI 抗体価 (160~320)

は、ホモ価（320）と比べて同等か2倍以内の違いであった。また、これらの分離株は残りの2種類の感染血清に対しても B/Phuket/3073/2013 と同様の反応性を示した。これらの結果は、解析した 2017/18 と 2018/19 シーズンの B/山形系統分離株全てが同シーズンのワクチン株（B/Phuket/3073/2013）と遺伝的にも抗原的にも類似していることを示している。

最近の B/Victoria 系統流行株は、HA 遺伝子系統樹において、複数のクレード(クレード1~5)に分類され、クレード1は更に2つのサブクレード(1A、1B)に分類される。解析した B/Victoria 系統の7株は、2017/18 シーズンあるいは2018/19 シーズンに使用された B/Victoria 系統ワクチン株 (B/Texas/02/2013、B/Colorado/06/2017) に代表されるクレード1Aに属した。2017/18 シーズンの2株と2018/19 シーズンの2株の HA は、B/Colorado/06/2017 株で見られた HA の162番目と163番目のアミノ酸が欠損していた。2018/19 シーズンの残りの3株の HA は、162番目から164番目の3アミノ酸が欠損していた。2種類のフェレット感染血清を用いた HI 試験により抗原解析を行った。7株に対する B/Texas/02/2013 感染血清の HI 抗体価（80~160）は、いずれもホモ価（1280）と比べて8倍以上低下していた。2アミノ酸欠損を有する4株に対する B/Colorado/06/2017 フェレット感染血清の HI 抗体価（1280）は、ホモ価（1280）と同じであったが、3アミノ酸欠損を持つ3株に対する B/Colorado/06/2017 感染血清の HI 抗体価（160~320）は、ホモ価（1280）と比べて4倍以上低下していた。以上の成績から、HA に2アミノ酸欠損を持つ B/ Victoria 系統株の抗原性状は、2017/18 シーズンのワクチン株（B/Texas/02/2013）とは大きく異なることがわかった。しかし、この2アミノ酸欠損株は同じ2アミノ酸欠損を持つ2018/19 シーズンのワクチン株 (B/Colorado/06/2017) とは類似していた。一方、3アミノ酸欠損を持つ3株の抗原性状は、両シーズンのワクチン株とは異なることが示唆された。

68株の NA 遺伝子の塩基配列を決定し、既知の NA 阻害剤耐性変異を有しているのかどうかを調べた。その結果、既知のアミノ酸変異 [Hatakeyama et al., 2007; 407番目のアミノ酸がグリシンからセリンに (G407S)] を有する B/山形系統1株 (B/Tokyo/UT-AC032/2018) が2017/18 シーズンに検出された。この株の NA 阻害剤(オセルタミビル、ザナミビル、ペラミビル、ラニナミビル)に対する感受性試験を行ったところ、感受性参照株と比較してどの薬剤においても IC₅₀ 値の上昇が認められた(8~200倍程度)。この NA 阻害剤に対して感受性が低下した変異株は、薬剤治療前の患者から採取された検体から分離された。このことは同変異株がヒトからヒトに伝播した可能性を示唆している。

本研究において、2017/18 シーズンの B/Victoria 系統ワクチン株 (B/Texas/02/2013) から抗原性が大きく変化した HA に2アミノ酸欠損を持つ B/Victoria 系統流行株を2017/18 と2018/19 シーズンに検出した。さらに、2018/19 シーズンには、同シーズンの B/Victoria 系統

ワクチン株（B/Colorado/06/2017）とは抗原性が異なるとみられる HA に 3 アミノ酸欠損を持つ B/Victoria 系統流行株を検出した。この 3 アミノ酸欠損を持つ抗原変異株は、2018/19 シーズンに多くの国々で検出されていることから、2019/ 20 シーズン以降 B/Victoria 系統流行株の主流になるのかどうか、その動向に注意が必要である。また、抗インフルエンザ薬に対して感受性低下を示すウイルスが薬剤治療前の患者から検出された。この薬剤低感受性株がヒトからヒトに広がっていくのか、その継続的なモニタリングが重要である。