

資料

2006/07 シーズン山形県で分離された AH3 型インフルエンザについて

青木洋子, 須藤亜寿佳, 水田克巳, 大谷勝実

Isolation of Human Influenza AH3 Viruses in Yamagata, Japan in the 2006–07 Influenza Season

by Yoko AOKI, Asuka SUTO, Katsumi MIZUTA,
and Katsumi OOTANI

2006/07 シーズン, 山形県ではインフルエンザ AH1 (A ソ連) 型, AH3 (A 香港) 型, B 型が混合流行し, シーズン初めに分離されたインフルエンザウイルスは, 赤血球凝集抑制試験で AH3 型であると同定された. 一方, RT-PCR 法による遺伝子増幅が認められなかった. そこで3種類のプライマーペアを用いたところ, AH3 型遺伝子が増幅されるものとそうでないものがあることがわかった.

2003/04 シーズンから 2006/07 シーズンに MDCK 細胞で分離された AH3 型インフルエンザ 20 株を用いて同様に遺伝子増幅したところ, 使用するプライマーによって増幅できない現象は 2005/06 シーズンの株から見られるようになり, 2006/07 シーズン分離株は全て増幅できないことが判明した. 2003/04 と 2006/07 シーズン株をシーケンスし比較すると, プライマーの結合部位に変異が生じており, これによりプライマーが結合せず PCR 反応が進まなかったと推察された.

Key Words インフルエンザウイルス, RT-PCR, シークエンス

I はじめに

高病原性鳥インフルエンザ (H5N1 型) が変異し, ヒトからヒトへ感染して大流行を起こすことが警戒されている一方, これまで知られているインフルエンザも, 毎年流行を繰り返している. インフルエンザは我々にとっては身近な感染症であるとともに, 高齢者や乳幼児などのハイリスクグループにとっては生命を脅かす恐ろしい病原体でもある.

2006/07 シーズン山形県では AH1 (A ソ連) 型, AH3 (A 香港) 型, B 型が混合流行した. シーズンの初めに分離された AH3 型が, 赤血球凝集抑制試験 (以下 HI 試験) で同定されたが, 同時に行った RT-PCR 法による遺伝子検出では検出できない事例を経験したので報告する.

II 材料と方法

1. 材料

2003~2007 年に, 山形県感染症発生动向調査により定点医療機関を受診した患者の咽頭拭い液および鼻汁から MDCK 細胞で分離された AH3 型インフルエンザウイルス 20 株を用いた.

2. 方法

(1) HI 試験

国立感染症研究所より分与された 2006/07 シーズン用インフルエンザ同定キット (抗血清) を使用し 0.8%モルト赤血球で HI 試験による型別同定を行った.

また, 2003/04 シーズン用キット AH3 型抗血清 A/パナ/2007/99 を使用し抗原性を比較した.

(2) RNA の抽出と RT 反応による c-DNA の作製

分離株 100 μ l から High Pure Viral RNA kit (ロッジ社製) で RNA を抽出した. 表 1 に示した RT 反応液に RNase Inhibitor, MuLV Reverse Transcriptase を各々 10U, 20U 加え, これに抽出した RNA 液 5 μ l 入れ, 30°C 10 分, 37°C 45 分の条件で c-DNA を作製した.

表1 RT-PCR反応液

0.1M DTT	100 μ l
2mM dNTPs	100 μ l
\times 10PCR Buffer	200 μ l
25mM MgCl ₂	200 μ l
random primer	50 μ l
DDW	850 μ l

表2 PCR反応液

25mM MgCl ₂	60 μ l
2mM dNTPs	50 μ l
\times 10PCR Buffer	100 μ l
10 μ M Primer F	50 μ l
10 μ M Primer R	50 μ l
DDW	720 μ l

(3) PCR 法による遺伝子の検出およびシーケンスによる塩基配列の解析

表2に示した PCR 反応液に、表3に示したプライマーセットを用いて PCR 法 (94°C5 分1 サイクル, 94°C30 秒-50°C30 秒-72°C1 分40 サイクル, 72°C7 分1 サイクル) により AH3 型遺伝子の検出を行い、シーケンスにより塩基配列の比較検討をした。

表3 プライマーの塩基配列

	プライマー名	配列
1st	① AH3N2FP	5'TGAAGTGACTAATGCTACTG-3'
	② AH3N2FM	5'ACAGACCCCTTACCCAGGGT-3'
2nd	③ AH3N2SP	5'GCAACTGTTACCCCTTATGAT-3'
	④ AH3N2SM	5'TCATTGTTTGGCATAGTCAC-3'
1st	⑤ AH ₃ G5'd ²	5'AAGCAGGGGATAATTCTATT-3'
	⑥ AH ₃ I5'd ²	5'TCCCTCCCAACCATTTTCTA-3'

プライマー名は、仮に設定した

Ⅲ 結果

(1) HI 試験による型別同定 (表4)

2006/07 シーズン分離株は、インフルエンザ同定キットで、A/広島/52/2005 により 160 倍まで凝集抑制され、AH1 型、B 型には 10 倍以下を示したので、AH3 型であると同定された。

表4 AH3 型に対する HI 価

	A/パナマ /2007/99	A/広島 /52/2005
A/山形/039/2004	80	40
A/山形/060/2004	80	40
A/山形/063/2004	160	80
A/山形/077/2004	80	80
A/山形/079/2004	40	40
A/山形/089/2004	20	40
A/山形/148/2005	20	40
A/山形/158/2005	80	80
A/山形/211/2005	10	40
A/山形/238/2005	10	160
A/山形/257/2005	10	80
A/山形/28/2006	10	160
A/山形/34/2006	10	160
A/山形/37/2006	10	320
A/山形/60/2006	10	320
A/山形/49/2006	< 10	160
A/山形/31/2007	< 10	320
A/山形/72/2007	< 10	320
A/山形/74/2007	< 10	160
A/山形/77/2007	< 10	160
A/パナマ/2007/99	320	< 10
A/広島/52/2005	10	640

(2) HI 試験による AH3 型抗原性 (表4)

2003~2007 年に分離された 20 株について AH3 型の抗原性を A/パナマ/2007/99 と、A/広島/52/2005 を用いて比較した。

2004~2005 年前半の株は、A/パナマ/2007/99 に 20~160 倍、A/広島/52/2005 に対して 40~80 倍の HI 価を示した。

これ以降の分離株は、A/パナマ/2007/99 に対して 10 倍~10 倍以下、A/広島/52/2005 に対して 80~320 倍の HI 価を示した。

(3) RT-PCR 法による遺伝子検出

2003~2007 年に分離された 20 株について、表3に示した 3 つのプライマーセットを使用して PCR を実施した。

表5に結果を示したとおり、①/②のペアでは、20 株中 10 株が遺伝子は増幅されず、③/④と、⑤/⑥ペアを用いたところ、20 株すべて遺伝子を増幅することができた。

表5 プライマーごとの AH3N2 遺伝子の検出

	①/②	③/④	⑤/⑥
A/山形/039/2004	+	+	+
A/山形/060/2004	+	+	+
A/山形/063/2004	+	+	+
A/山形/077/2004	+	+	+
A/山形/079/2004	+	+	+
A/山形/089/2004	+	+	+
A/山形/148/2005	+	+	+
A/山形/158/2005	+	+	+
A/山形/211/2005	-	+	+
A/山形/238/2005	-	+	+
A/山形/257/2005	+	+	+
A/山形/28/2006	-	+	+
A/山形/34/2006	+	+	+
A/山形/37/2006	-	+	+
A/山形/60/2006	-	+	+
A/山形/49/2006	-	+	+
A/山形/31/2007	-	+	+
A/山形/72/2007	-	+	+
A/山形/74/2007	-	+	+
A/山形/77/2007	-	+	+

(4) シーケンスによる遺伝子解析結果

①②③④のプライマー結合部位をはさむ⑤/⑥のプライマー増幅産物を用い、2003/04 シーズンと 2006/07 シーズン分離株について H3 遺伝子の塩基配列を明らかにした。

図1に示したとおり、プライマー② (20mer) の結合する部位で、2003/04 シーズン株では 5 箇所、2006/07 シーズン株では 7 箇所の塩基が変異していた。

なお、これらの塩基配列については、AB327097 ~

AB327105 で GenBank に登録した。

IV 考察

2003～2007年、AH3型は、全国的に流行を繰り返しており山形県でも毎年分離されていた。この間、ワクチン推奨株が、毎年更新されるなど抗原性が変化していた。分離株20株を2003/04と2006/07シーズンキットを用いてHI試験で抗原性を比較した。2005年後半以降に分離された株は、A/パナマ/2007/99に対して10倍～10倍以下のHI価を示し、明らかに抗原性が異なることを確認した。

2006/07シーズンはじめに分離されたインフルエンザウイルスは、HI試験ではAH3型と同定されたが、PCR法による遺伝子検査から通常使用していたプライマーペア①/②では検出されることがわかった。しかし、遺伝子との結合部位が異なるプライマーペア③/④と、⑤/⑥を用いればAH3型の遺伝子増幅が確認することができた。

分離株20株について、3種類のプライマーペアを用いて同様の遺伝子検出をしたところ、プライマー①/②で遺伝子増幅されないH3型が年々増えていることがわかった。これは、2005年後半の分離株からみられ、2006/07シーズンに分離された株は、全て検出されなかった。このことは、直接的には抗原性と関連づけられないが、A/パナマ/2007/99へのHI価が10倍以下になったのと同時期であることがわかった。

遺伝子検出が不可能となったのは、塩基配列に変異が生じているためと思われたためシーケンスを行った。2004年と2007年の株は、プライマー②が結合する部位で、各々5箇所、7箇所の塩基が変異していた。2003/04分離株は遺伝子増幅が可能であったことから、プライマーは結合できたと考えられた。しかし、2006/07株は、さらに2

箇所の変異が加わったので遺伝子の増幅が起らなくなったものと推察された。

PCR法に使用するプライマーは、変異に影響されにくい部分で設計されているが、常に変異を繰り返しているAH3型では、変異の程度により反応しなくなっていく事がわかった。

V まとめ

H3型インフルエンザウイルスは、遺伝子の変異がおりやすいことが知られているが、プライマーは通常、変異の少ない部分を選択している。しかし、プライマーの結合する部分の塩基配列に変異が生じることにより、遺伝子が増幅されず、分離が難しい検体や微量ウイルスの遺伝子検出が行えず、検査の精度が落ちてしまうことも考えられた。遺伝子検査を行う際は、常にこのことを念頭に置き、情報の収集や交換をしながら検査を進めなければならないと思われた。

文献

- 1) 国立感染症感染症情報センター：病原微生物検出情報 28, 311-313, 2007
- 2) J.S.Ellis et al.: Arch Virol, 140, 1889-1904, 1995

図1 AH3N2FMプライマーとの相同性

		5' A C A G A C C C T T A C C C A G G G T 3'
遺伝子検出		3' T G T C T G G G A A T G G G T C C C A 5'
A/山形/039/2004	○	C C - G - A - - - - - - - - A - - - -
A/山形/060/2004	○	C C - G - A - - - - - - - - A - - - -
A/山形/063/2004	○	C C - G - A - - - - - - - - A - - - -
A/山形/079/2004	○	C C - G - A - - - - - - - - A - - - -
A/山形/079/2004	○	C C - G - A - - - - - - - - A - - - -
A/山形/31/2007	×	C C - A - A A - - - - - - A - A - - - -
A/山形/72/2007	×	C C - A - A A - - - - - - A - A - - - -
A/山形/74/2007	×	C C - A - A A - - - - - - A - A - - - -
A/山形/77/2007	×	C C - A - A A - - - - - - A - A - - - -