

令和元年6月6日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19269

研究課題名(和文)新規4価ワクチン導入後のB型インフルエンザウイルスの進化・伝播経路の解明

研究課題名(英文) Analysis of evolution and transmission route of influenza B viruses after introduction of novel quadrivalent influenza vaccine

研究代表者

小田切 崇 (ODAGIRI, TAKASHI)

岩手医科大学・医学部・任期付助教

研究者番号：80770221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：2015/2016シーズンより新規インフルエンザワクチンが導入された。本研究では新規ワクチン導入後のB型ウイルスの流行動態の解析ならびに進化動態の解析を試みた。その結果、研究期間中のB型ウイルスの流行はVictoria系統とYamagata系統の混合流行であったものの、その比率は各シーズンで異なっていたことが分かった。また現時点では抗原性を大きく変化させるような遺伝子変異は起きてはならず、遺伝子置換速度(=ウイルス進化速度)は新規ワクチン導入前後で大きく変化していないことが明らかとなった。今後、ウイルス進化速度が変化しないにもかかわらず大規模な流行に繋がる因子の特定が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザワクチンは、公衆衛生上インフルエンザの感染制御を考えるのに非常に重要なものである。新規ワクチン導入後のウイルスの流行様式の変化、ウイルス遺伝子の変異、変異の発生頻度を捉え、解析することは今後さらに新たなワクチンを導入する際の先駆的知見を与えるものであると考えられる。本研究はA型インフルエンザウイルスに比べ未だ不明な点を多く残すB型インフルエンザウイルスに焦点をあてたものであり、得られた知見はウイルス感染防御対策を念頭に置いたワクチン戦略を立てる上で有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：From 2015/2016 season, the novel influenza vaccine was introduced in Japan. In this study project, we analyzed the epidemiology and evolutionary pattern of influenza B viruses after novel influenza vaccine introduction. We revealed Victoria and Yamagata lineages were co-circulated during study period. However the ratio of Victoria and Yamagata lineages were different in each season. Although, some strains which had isolated in our study had the amino acid mutations, we could not identify the mutation which associated with antigenic change. And we found the substitution rate was not so much different among pre- and post-introduction of novel influenza vaccine. Further study would unveil the factors which associate with large scale epidemics of influenza B viruses.

研究分野：公衆衛生

キーワード：インフルエンザウイルス インフルエンザワクチン インフルエンザ流行 ウイルス進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスにより、毎年世界で多様な規模の流行が見られ、世界人口の 15% が感染し、25-50 万人が死亡している (1)。これに対しインフルエンザワクチンは、公衆衛生上インフルエンザの感染制御を考えるのに非常に重要なものである。従来のインフルエンザワクチンは、A 型の 2 種類 (H1N1、H3N2) と B 型のいずれか 1 種類を混合させた 3 価であった。したがって実際に流行する系統とワクチンに含まれる系統が合致していない (ミスマッチ) ことが度々生じて、問題とされていた。

このような状況を打開するために、2015/2016 シーズンから日本でも B 型の 2 系統を両方用いた 4 価のワクチンが導入されたが、このような新規ワクチン導入による干渉からウイルスが生き残るために遺伝子変異や遺伝子再集合 (リアソートメント) などを起こし、これまでに流行が観られなかった新しいウイルスが出現することが考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規 4 価ワクチン導入によって B 型インフルエンザウイルスが生き残るためにまたウイルスが生き残るためにどのように変化 (= 進化) し、その後の流行へとつながっていくのかを明らかにすることを目指した。そこでワクチンのターゲットとなる HA タンパクをコードする HA 遺伝子にまず焦点をあて、遺伝学的解析検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 日本の小児科医 (北海道、新潟、群馬、静岡、京都、奈良、長崎、沖縄) と直接連携し、インフルエンザ様症状を呈して来院した患者から鼻咽頭ぬぐい液を採取してもらった。採取した鼻咽頭拭い液をインフルエンザウイルスに感受性のあるイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞 (MDCK 細胞) に接種しインフルエンザウイルスの分離を試みた。

分離に成功したウイルスに対して Realtime-PCR を使った Cycling Probe 法によるウイルスの型・亜型判定を行い、インフルエンザ流行曲線を作成することで各シーズンのインフルエンザ流行様式を調査した。

2) 分離に成功したウイルスのうち型・亜型判定において B 型インフルエンザウイルスと判定された場合、ウイルスを含んでいる細胞培養上清から核酸を抽出しインフルエンザウイルスに特異的なプライマーを使って逆転写反応後、cDNA 合成を行った後、Conventional PCR で HA 遺伝子を増幅させ、塩基配列をサンガー法シーケンスにて決定した。流行した B 型インフルエンザウイルスの遺伝子的特徴を明らかにするため、遺伝子系統樹を作成した。

3) 決定した遺伝子配列情報をもとに遺伝子置換速度 (= 進化速度) を Bayesian evolutionary analysis by sampling trees (BEAST) を用いて新規 4 価ワクチン導入前後で検討を試みた。

4. 研究成果

1) 4 価ワクチンが導入されて以降の

2015-2018 年にかけての 3 シーズンで合計 2,387 件の鼻咽頭拭い液を採取し、636 株の B 型インフルエンザウイルスの分離に成功した。各シーズンの流行曲線を作成して流行動態を比較した。日本では通常 A 型インフルエンザウイルスの

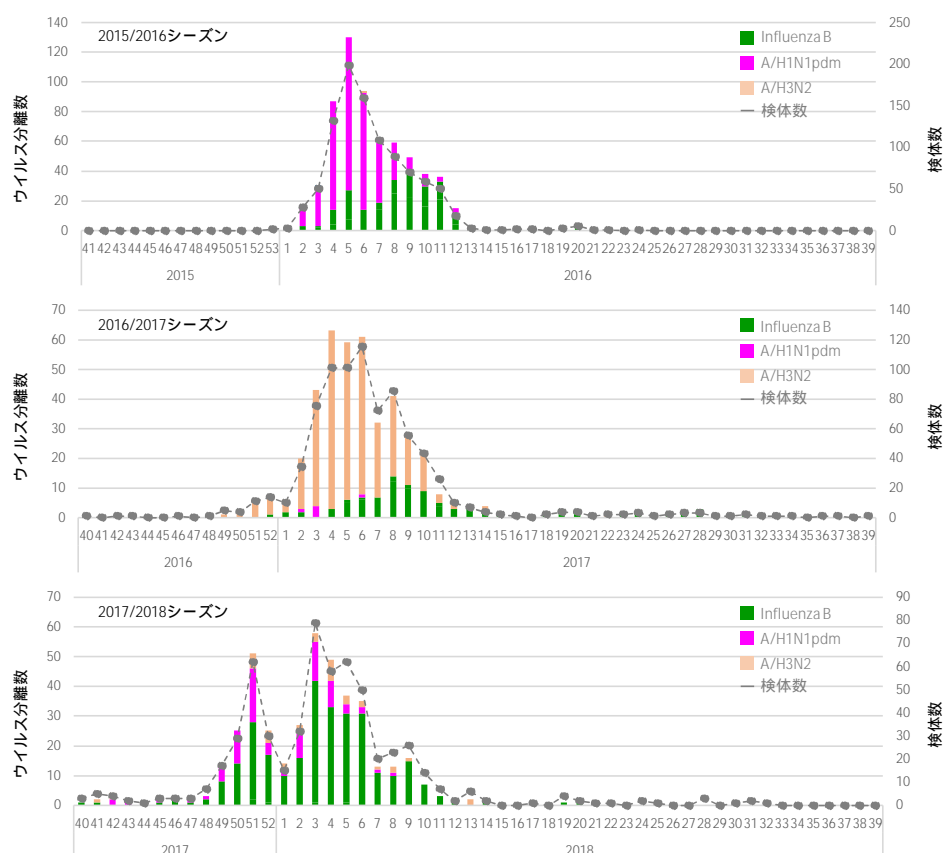


図1 各シーズンのインフルエンザ流行曲線

流行がピークを迎え終息を始める頃に B 型インフルエンザウイルスは流行のピークを迎えることが知られている。2015/2016 シーズン、2016/2017 シーズンの B 型インフルエンザウイルスの流行はこれまで日本で見られていた流行とよく似た流行様式であった。しかしながら 2017/2018 は B 型インフルエンザの流行の開始時期が早く、前シーズンと比較して流行期間中には B 型インフルエンザの活動性がより長期間観察されより大きな流行となった(図 1)。この 2017/2018 シーズンの日本の流行と同様の傾向がヨーロッパや北米においてもみられており、特にヨーロッパのほとんどの国で B 型インフルエンザウイルスが優勢でありカナダや米国で検出されたウイルスの 30~40%、中央アジアでは 40~50%が B 型インフルエンザウイルスであったという報告がある(2)。

また、各シーズンで分離された B 型インフルエンザウイルスにおけるビクトリア系統と山形系統の割合を比較した。2015/2016~2017/2018 の 3 シーズンともにビクトリア系統と山形系統の混合流行であった

が、各シーズンでビクトリア系統と山形系統の割合が変化していたことが明らかになった。本研究で調査した地域での B 型インフルエンザウイルスの流行は 2015/2016、2016/2017 シーズンはビクトリア系統が優勢であったのに対し、2017/2018 シーズンは一転して山形系統が優勢の流行であった(図 2)。

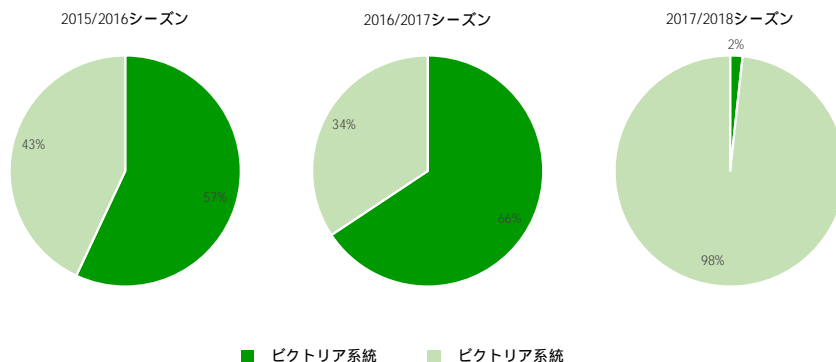


図 2 各シーズンのビクトリア系統と山形系統の割合

2) 2015/2016~2017/2018 に分離に成功した B 型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子全長の塩基配列を決定し進化系統樹解析を行った。

解析の結果、ビクトリア系統は HA 遺伝子に N75K、N165K、S172P アミノ酸置換を持つクレード 1A (ワクチン株であった B/Texas/2/2013 株が代表株) に属していた。これらのアミノ酸変異に加え、2016/2017 シーズン以降の株は共通アミノ酸置換 N129D、I117V、V146I を持つクレードに属しており、クレード 1A の中でも遺伝子の多様化が進んでいることが明らかとなった(図 3)。

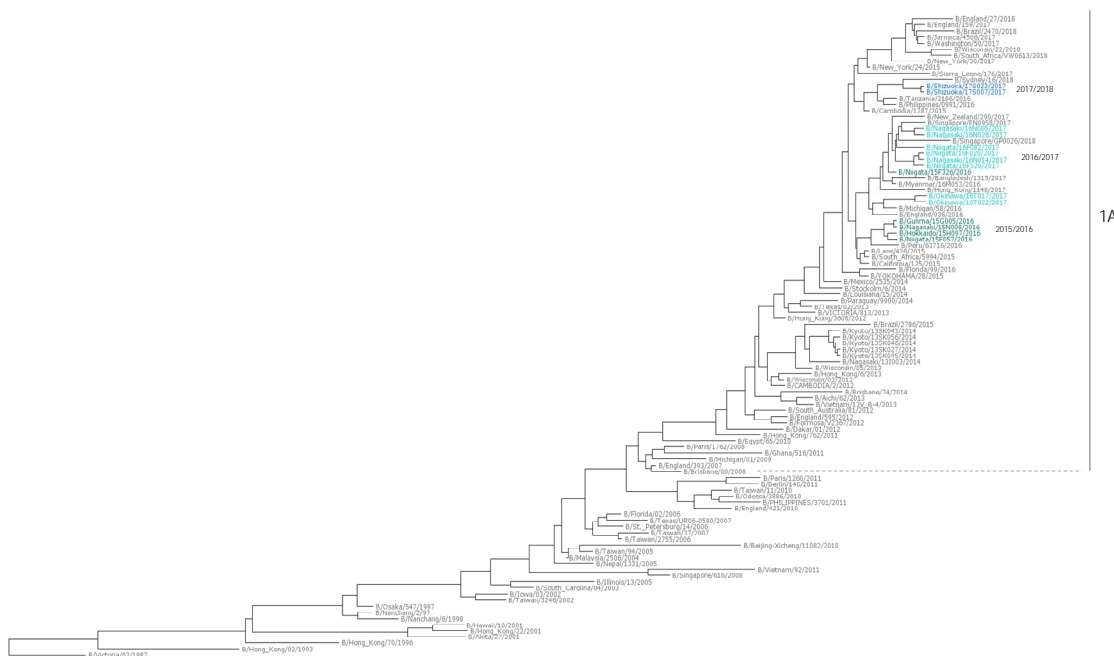


図 3 ビクトリア系統の系統樹解析

また 2016/17 シーズンから米国を中心に 162 番目および 163 番目の 2 アミノ酸を欠損した抗原変異株が出現した。この抗原変異株は 2017/18 シーズンには流行地域をさらに拡大し、日本でもわずかではあるものの検出の報告があったが、本研究での検体採取地域では検出されなかった。

一方、山形系統は HA 遺伝子に S150I, N165Y, N202S, S229D アミノ酸置換を持つクレード 3 (ワクチン株であった B/Phuket/3073/2013 株が代表株) に属していた。また 2017/2018 シーズン以降の株の多くがクレード 3 内で N116K, K298E, E312K, L172Q, M251V にアミノ酸変異を持っており、ピクトリア系統同様、山形系統でもクレード内での遺伝子の多様化が進んでいることが

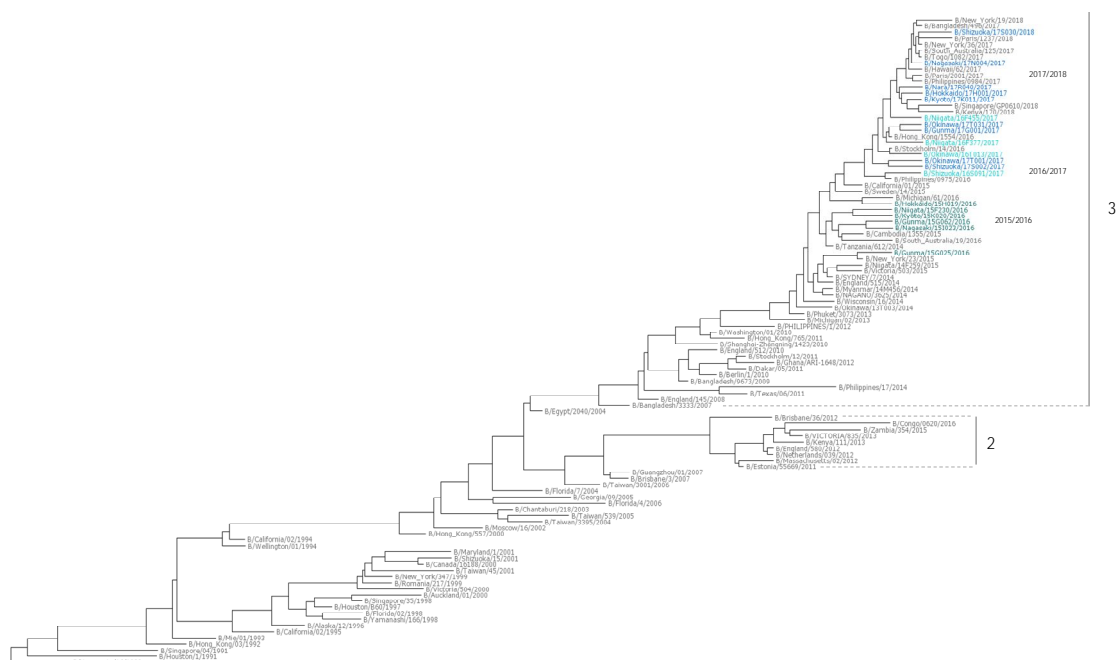


図 4 山形系統の系統樹解析

明らかとなった。

3) 決定した遺伝子配列配をもとにピクトリア系統と山形系統の遺伝子置換速度 (= 進化速度) の推定を試みた。A 型インフルエンザウイルスに比べ、B 型インフルエンザウイルスは置換速度が遅く、安定的であることが知られている。

本研究で得られた遺伝子情報と世界各国から報告されている配列情報を用いて置換速度を算出したが、新規 4 価ワクチン導入後と導入前では遺伝子置換速度に大きな違いはみられなかった。以上のことにより、新規 4 価ワクチン導入後 B 型インフルエンザウイルスは徐々に遺伝子変異を起こしながら流行していることが判明したが、大きなウイルス進化は起こしておらず、伝播経路の特定には至らなかったため、今後の課題として検討を行っていく必要があると考えられた。

< 引用文献 >

- (1) Otomaru H *et al.*, “Influenza and other respiratory viruses detected by influenza-like illness surveillance in Leyte Island, the Philippines, 2010-2013.” PLoS One. 2015 Apr 20;10(4):e0123755
- (2) ASR Vol. 39 p202: 2018 年 11 月号
(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/flu-m/flu-iasrf/8439-465f01.html>)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) Phylogeographic analysis of human influenza A and B viruses in Myanmar, 2010-2015. Htwe KTZ, Dapat C, Shobugawa Y, **Odagiri T**, Hibino A, Kondo H, Yagami R, Saito T, Takemae N, Tamura T, Watanabe H, Kyaw Y, Lin N, Myint YY, Tin HH, Thein W, Kyaw LL, Soe PE, Naito M, Zaraket H, Suzuki H, Abe T, Saito R. PLoS One. 2019 Jan 10;14(1):e0210550. DOI:10.1371/journal.pone.0210550
- (2) Neuraminidase inhibitor susceptibility and evolutionary analysis of human influenza B isolates from three Asian countries during 2012-2015. Hibino A, Massaad E, Kondo H, Saito R, **Odagiri T**, Takemae N, Tsunekuni R, Saito

T; Japanese Influenza Collaborative Study Group, Kyaw Y, Lin N, Myint YY, Tin HH, Le Khanh Hang N, Mai LQ, Yagami R, Shobugawa Y, Lam T, Zaraket H. Infection, Genetics and Evolution. 2018 Aug;62:27-33. DOI:10.1016/j.meegid.2018.04.016

(3) Local persistence and global dissemination play a significant role in the circulation of influenza B viruses in Leyte Island, Philippines.

Furuse Y*, Odagiri T*, Tamaki R, Kamigaki T, Otomaru H, Opinion J, Santo A, Dolina-Lacaba D, Daya E, Okamoto M, Saito-Obata M, Inobaya M, Tan A, Tallo V, Lupisan S, Suzuki A, Oshitani H.

* equal contribution

Virology. 2016 May;492:21-4.

DOI:10.1016/j.virol.2016.02.001

(4) Full Genome Characterization of Human Influenza A/H3N2 Isolates from Asian Countries Reveals a Rare Amantadine Resistance-Confering Mutation and Novel PB1-F2 Polymorphisms.

Zaraket H, Kondo H, Hibino A, Yagami R, Odagiri T, Takemae N, Tsunekuni R, Saito T; Japanese Influenza Collaborative Study Group, Myint YY, Kyaw Y, Oo KY, Tin HH, Lin N, Anh NP, Hang Nle K, Mai le Q, Hassan MR, Shobugawa Y, Tang J, Dbaibo G, Saito R.

Frontiers in Microbiology. 2016 Mar 7;7:262.

DOI:10.3389/fmicb.2016.00262

〔学会発表〕(計 1件)

小田切 崇、日比野 亮信、八神 錬、近藤 大貴、菖蒲川 由郷、齋藤 玲子

Immune response of quadrivalent inactivated influenza vaccines in 2015/2016 and 2016/2017 season.

第65回日本ウイルス学会学術集会

2017年10月24-26日

大阪国際会議場(大阪市北区)

〔その他〕

ホームページ等

新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際保健学分野ホームページ

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/pub/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者氏名：小田切 崇

ローマ字氏名：Takashi Odagiri

所属研究機関名：岩手医科大学

部局名：医学部 微生物学講座 感染症学・免疫学分野

職名：助教

研究者番号(8桁)：80770221

(2) 研究協力者

齋藤 玲子(Reiko Saito)

菖蒲川 由郷(Yugo Shobugawa)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。