

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860476

研究課題名(和文) NA活性はインフルエンザウイルスの流行形成と増殖性に影響を及ぼすか

研究課題名(英文) Impact of NA activity on the properties of influenza virus

研究代表者

廣井 聡 (HIROI, SATOSHI)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：40455548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスの性状にNA活性が及ぼす影響を明らかにするためにH1N1pdm09の臨床分離株40株のNA活性を解析した。その結果、株によりNA活性が異なることを確認し、さらに、NA活性が最も低い3株はすべてNAにH275Y変異を持つNA阻害剤耐性ウイルスであることが明らかとなった。高NA活性株、低NA活性薬剤感受性株、薬剤耐性株の各グループについて解析を行ったが、NA活性と比較して、H275Y以外のNAの変異やウイルスの増殖性に特徴はみとめられず、ウイルスの性状に違いは確認できなかった。NA阻害剤耐性ウイルスのNA活性が感受性株と異なる意義についてはさらなる解析が必要だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To evaluate effect of NA activity on the properties of influenza A H1N1pdm viruses, a total of 40 isolated strains including three oseltamivir resistant strains were analyzed. The results showed that the strains have different NA activities, and all oseltamivir resistant strains with H275Y mutation in the NA have lower activity than H275 strains. Phylogenetic analysis of NA gene showed that NA activity of oseltamivir sensitive strains was not correlated with specific mutation, and NA activity did not have obvious impact on replication ability of the strains. The functional significance of the NA activity of oseltamivir resistant strains should be further investigated.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス HA NA

1. 研究開始当初の背景

ノイラミニダーゼ (NA) は、ヘマグルチニン (HA) と共にインフルエンザウイルスの表面に存在する糖タンパクで、インフルエンザウイルスの感染には HA と NA がバランスよく機能することが重要とされる。また、NA は一般的に使用される抗インフルエンザウイルス薬 (NA 阻害剤) の作用点でもある。2009 年に出現した A 型インフルエンザウイルス H1N1pdm は、NA の変異 (H275Y 変異) により薬剤耐性となることが知られており、国内でも耐性株が検出されている。

例年、分離された流行株を用いて行われるインフルエンザウイルスの解析は、HA の活性を指標とした赤血球凝集抑制試験 (HI) による抗原性の解析や、HA および NA 遺伝子の解析が中心で、特に NA については薬剤耐性となる遺伝子変異の解析に主眼が置かれており、臨床分離株の NA 活性を測定して比較したり、その活性がウイルスの性状にどのような影響を持つかを調べたりした報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インフルエンザウイルスの NA 活性がインフルエンザの流行やウイルスの性状に及ぼす影響を明らかにすることである。そこで、H1N1pdm 臨床分離株の NA 活性を測定することによって、以下の点を中心に検討を行った。

- 流行株の NA 活性が株ごとに異なるか。
- ウイルスが分離された時期によって NA 活性が異なるか。
- NA 阻害剤感受性株と耐性株の NA 活性に違いがあるか。
- NA の塩基配列と NA 活性に何らかの関連があるか。
- NA 活性がインフルエンザウイルスの増殖能に影響を及ぼすか。

3. 研究の方法

[1] ウイルス株

2009 年度から 2012 年度の間に大阪府の病原体サーベイランスで得られた H1N1pdm09 の臨床分離株を用いた。

分離株のウイルス量を確認するために、各株の TCID₅₀ 法 (50% 感染量) によるウイルス力価の測定、HA (血球凝集素) 価測定、ELISA 法による NP のタンパク量測定、リアルタイム PCR 法による NA 遺伝子のコピー数測定を行った。

ウイルス量測定の結果を踏まえて、NA のコピー数を基準として NA 活性の検討を進めることとし、最終的に 10⁷ コピー/25μL 以上のウイルス量を持つ分離株 40 株 (薬剤耐性株 3 株を含む) を本研究に用いた。

[2] NA 活性測定

NA のコピー数が 10⁷ コピー/25μL となるよう

に調整した各株の NA 活性を、MUNANA 基質を用いた蛍光法により測定した。得られた測定結果から NA 活性に特徴がある株を、高 NA 活性株、薬剤感受性の低 NA 活性株 (H275) 薬剤耐性の低 NA 活性株 (Y275) の 3 グループに分類し、それぞれ 3 株ずつを解析に用いた。高 NA 活性株および薬剤感受性の低 NA 活性株については NA 阻害剤であるオセルタミビルに対する感受性試験も蛍光法により行い、IC₅₀ (NA 活性 50% 阻害濃度) を決定した。薬剤耐性株についてはオセルタミビルに対する感受性が低下していることから比較できないため測定していない。

[3] 遺伝子解析

全ての分離株の NA 遺伝子について全長の塩基配列を決定し、ClustalW を用いて近隣結合法により分子系統解析を行い、NA 活性と比較した。

また、高 NA 活性株、薬剤感受性の低 NA 活性株、薬剤耐性の低 NA 活性株それぞれ 3 株ずつについては、HA 遺伝子全長の塩基配列も決定し、NA と同様の方法で分子系統解析を行い、NA 活性と比較した。

[4] ウイルス増殖能の検討

ウイルスの増殖性を検討するために、高 NA 活性株、薬剤感受性の低 NA 活性株、薬剤耐性の低 NA 活性株のそれぞれ 3 株ずつを用いて感染実験を行った。

NA のコピー数が 10⁷ コピー/100μL となるよう調整した各株のウイルス液を 48 穴プレート上の MDCK 細胞へ 30 分吸着させることによりインフルエンザウイルスを感染させ、感染 24、48、72 時間後の培養上清を回収した。上清中のウイルス量は M 遺伝子のコピー数をリアルタイム PCR 法により決定し、グループごとのコピー数の平均値を算出して比較した。

4. 研究成果

[1] NA 活性

図 1 に示すように、2009 年から 2013 年に分離された H1N1pdm 各株の NA 活性は、株によって異なることが明らかとなった。最も NA 活性が高い株と最も低い株で蛍光強度 (RFU) に 4.4 倍の差があった。

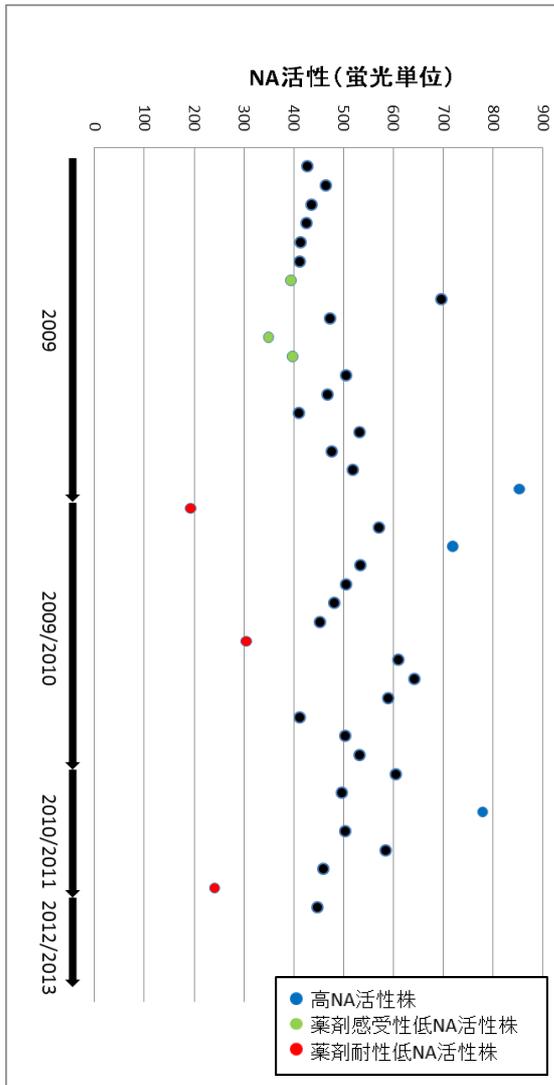
さらに、NA 活性が最も低い 3 株はすべて NA H275Y 変異を持つ抗インフルエンザ薬耐性ウイルスであることが明らかとなった。NP のタンパク量を基準として NA 活性を測定した場合でも、耐性変異株 3 株の NA 活性が最も低い結果となった。薬剤感受性株だけで比較すると、最も NA 活性が低い株は最大の株と 2.4 倍の差であった。

時系列で見ると、2009 年のウイルス出現時から 2013 年まで、NA 活性が高い株と低い株が混在していて、いずれの時期も株間の NA 活性にばらつきがあった。従って、ウイルスが分離された時期と NA 活性との間に相関はみ

とめられず、NA 活性が変化することによって流行が拡大するといった事象はみとめられなかった。

また、高 NA 活性株と薬剤感受性の低 NA 活性株それぞれ 3 株ずつを用いて行った薬剤感受性試験では、オセルタミビルに対する IC₅₀ の平均値がそれぞれ 0.127nM および 0.123nM となり、NA 活性が異なる株間で感受性に差は確認できなかった。

図 1、H1N1pdm 分離株の NA 活性



[2] 遺伝子解析

NA 遺伝子全長の系統樹解析を行った結果、各ウイルス株は分離された時期に沿う形で分類された。(図 2)

系統樹に高 NA 活性株、薬剤感受性の低 NA 活性株、薬剤耐性株を示しているが、H275Y 変異以外はそれぞれのグループで共通した変異はみとめられなかった。従って、NA の塩基配列を決定し解析することによって、分離株の NA 活性を予測することは困難だと考えられる。

また、高 NA 活性株、薬剤感受性の低 NA 活性株、薬剤耐性の低 NA 活性株のそれぞれ 3 株については、HA 遺伝子全長の系統樹解析も行

った。(図 3) その結果、HA は NA と同様にウイルスが分離された時期により分類され、NA 活性の違いによる HA の変異は確認できなかった。

図 2、NA の系統樹解析

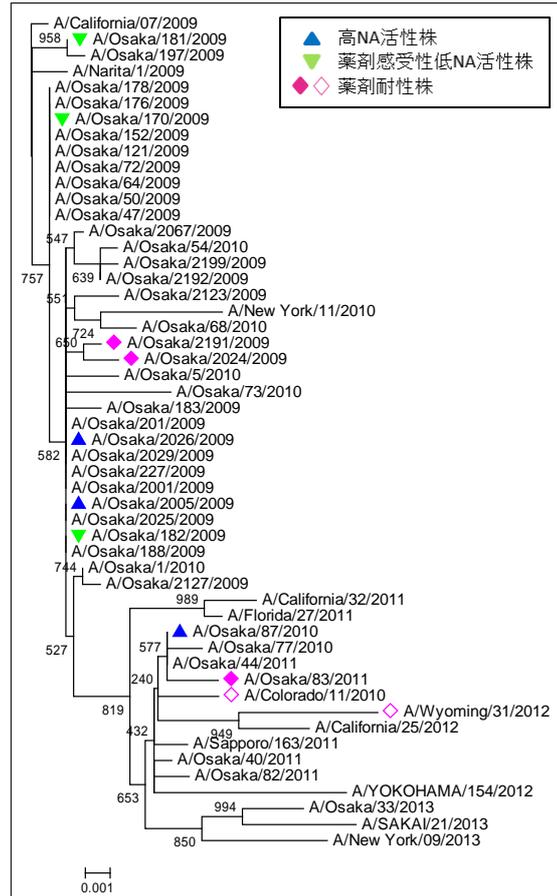
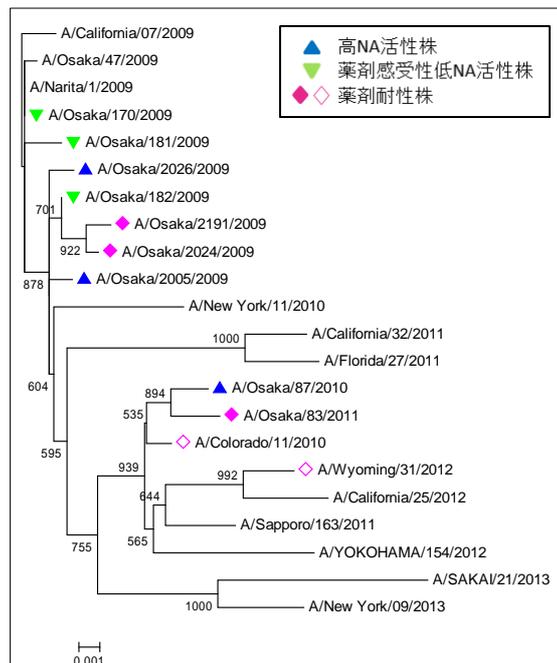


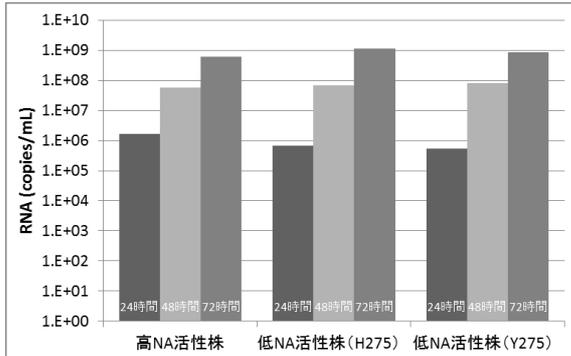
図 3、HA の系統樹解析



[3] ウイルスの増殖能

高 NA 活性株、薬剤感受性の低 NA 活性株 (H275)、薬剤耐性の低 NA 活性株 (Y275) のそれぞれ 3 株ずつを MDCK 細胞に感染させ、24、48、72 時間後の培養上清中のウイルス量 (M 遺伝子のコピー数) を比較した。その結果、図 4 に示すように明らかな差はなく、ウイルスの増殖性に違いはみとめられなかった。

図 4、感染 24、48、72 時間後のウイルス量の変化



[4] まとめ

以上の結果から、H1N1pdm09 の臨床分離株は株によって NA 活性が異なっていることが明らかとなった。しかし、ウイルスが分離された時期と NA 活性の間には関連がみられなかった。また、NA 活性と NA の塩基配列との関連は確認できず、ウイルスの増殖能にも影響は確認できなかった。これらの結果から、NA 活性の変化がウイルスの性状に影響しないように HA 活性が変化し、バランスを調整している可能性が考えられる。

本研究により NA に変異を持つ NA 阻害剤耐性ウイルス株の NA 活性が薬剤感受性株と比較して低いことが明らかとなった。変異によって NA 活性が低下する理由は現時点でははっきりしないが、これまでの報告で H275Y 変異に伴って NA の立体構造が変化することが知られており、この構造変化が NA 活性に影響していると推察される。

H1N1pdm の抗インフルエンザ薬耐性株について新たな知見が得られたことは、今後、耐性株の解析を進める上で、意義があるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

森川佐依子、廣井聡、高橋和郎、加瀬哲男
異なる MDCK 細胞から分離されたインフルエンザウイルス株の性状比較
第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013 年 11 月、神戸)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

廣井 聡 (HIROI SATOSHI)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任
研究員

研究者番号 : 4 0 4 5 5 5 4 8