

	り だんけん
氏 名	李 丹娟
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第266号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Genetic Analysis of Influenza A/H3N2 and A/H1N1 Viruses Circulating in Vietnam from 2001 to 2006 (ベトナムにおける2001~2006年のインフルエンザ A/H1N1 と A/H3N2 ウイルスの遺伝子進化の解析)
論文審査委員	主査 教授 藤 井 雅 寛 副査 教授 鈴 木 宏 副査 教授 山 本 達 男

博士論文の要旨

背景:

熱帯、亜熱帯地域では一年を通じてインフルエンザウイルスが分離され、冬期のみの温帯とは異なる流行形式を示し、ウイルス遺伝子の動向についての詳細は不明のままである。我々は2001~2006年の6年間にベトナムで採取されたA型インフルエンザウイルス(A/H1N1, A/H3N2)のヘマグルチニン(HA), ノイラミニダーゼ(NA)およびM蛋白(M)の遺伝子解析により、それらの進化様式の解明を試みた。

材料及び方法:

2001~2006年にベトナム国内の急性上気道炎患者より採取され、ハノイ市国立衛生疫学研究所(NIHE)にてMDCK細胞を用いて分離された35株のA/H1N1と30株のA/H3N2株について解析を行った。ウイルスRNAを抽出、A型インフルエンザに特異的なUni12プライマーを使用して逆転写反応を行い、cDNAを合成した。HAのHA1部位、NA及びMにそれぞれ特異的なプライマーを用いてPCRを行い、アガロース電気泳動で確認した。PCR産物を精製し、ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)でサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。更に、分離された株の塩基配列を遺伝子データベース登録株と共に配列を多重比較し、Neighbor-Joining法にて系統樹解析を行った。

結果:

30株の A/H3N2 について HA、NA、M それぞれの遺伝子を比較した。HA 遺伝子は年毎に変異が連続的にみられ、4つの群 (Group I ~IV) を形成した。A/Panama/2007/99 と比較すると、Group I に属する株は9つのアミノ酸置換があり、A/Panama/2007/99 と A/Fujian/411/02 の中間に位置する株であった。Group II に属している 2003 年株はさらに4つのアミノ酸変異を有し、A/Fujian/411/02 と近縁であった。2004 年株と 2005 年株の一部は Group III を形成し、K145N のアミノ酸変異により Group IIIa と IIIb に分類され、A/Wellington/7/04 と A/California/7/04 それぞれの類似株と確認された。2005 年に分離された株の大部分は M2 蛋白に S31N 変異をもつアマンタジン (Am) 耐性株であり、これらの株はさらに HA に特異的な二重変異 (S193F、D225N) を有し A/Wisconsin/67/05 を含む Group IV を形成した。NA は Group I と II に分かれた。NA の Group I は HA の Group I (2002 年株) と II (2003 年株)、Group II は HA の Group III (2003、2004 年株) と IV (2005 年株) によって構成された。M においても Group I と II に分かれた。M の Group I は HA の Group I、II、IV (2002、2003、2005 年株) で形成され、Group II は HA の Group III (2004、2005 年株) と同じであった。

一方、35株の A/H1N1 についても同様に HA、NA、M それぞれの遺伝子を比較した。HA 遺伝子は年毎に段階的な変化を示し、4つの群 (Group I ~IV) を形成した。Group I、II、III に属する株は全て A/New Caledonia/2007/99 の類似株とみられ、それぞれの Group で 2~3 のアミノ酸置換が確認された。Group IV に属する 2006 年に採取された 1 株は 9 つのアミノ酸置換が見られ、2007-08 年のワクチン株である A/Solomon Islands/3/06 と近縁であった。NA も HA と同様に年毎に Group I ~IV を形成し、NA と HA の Group の株は一致していた。M は HA の Group I ~III と Group IV とにより Group I と II に分かれた。2006 年の A/H1N1 の 1 株において A/New Caledonia 系の HA 遺伝子と A/Solomon Islands 系の NA、M 遺伝子を持つ遺伝子再集合ウイルスが認められた。

結論:

A/H3N2 の HA 遺伝子は、頻回に抗原領域部位のアミノ酸変異が起こり、年毎に抗原性の違う株が出現したが、一方 A/H1N1 では同部位の変異は少なく、A/H3N2 の方が A/H1N1 よりも HA 遺伝子の遺伝子進化速度が速いことが示唆された。特に A/H3N2 の Fujian 系統株では HA は年々変化しているにも関わらず、NA 遺伝子は数年間同じ遺伝子の挿入がみられ、M 遺伝子では数シーズン前の遺伝子と同じ遺伝子が再度組み込まれるなど、各遺伝子は独立して組み替えを起こしていることが示唆された。遺伝子再集合は多いとされる A/H3N2 だけではなく A/H1N1 でも見られた。

以上、熱帯・亜熱帯アジア地域のインフルエンザウイルス遺伝子進化を解析し、HA、NA、M の 3 遺伝子進化速度がそれぞれ異なり、HA、NA は、M 遺伝子よりも進化が早いことが確認された。なお、これらの抗原と関連する変化は日本よりも早期に見られ、熱帯・亜熱帯における通年のサーベイランスによるインフルエンザウイルス遺伝子の検索は、新しい抗原性を持つウイルスをいち早く検出できる可能性が強く示唆された。

(論文審査の要旨)

温帯とは異なり、熱帯、亜熱帯地域では一年を通じてインフルエンザウイルスが分離され、遺伝子の動向は不明のままである。本研究において2001~2006年にベトナムで採取されたインフルエンザウイルスのHA(Haemagglutinin), NA(Neuraminidase)及びM(Matrix)蛋白の遺伝子進化様式の解明を試みた。

35株のA/H1N1と30株のA/H3N2株を用い、ウイルスRNAを抽出後、RTを行い、HA, NA, Mの3つの遺伝子をPCR増幅後シーケンスにて塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。

A/H3N2のHA遺伝子は、年毎に抗原性の違う株が出現したが、NAは数年間同じ遺伝子の挿入が見られ、Mでは数シーズン前の遺伝子と同じ遺伝子が再度組み込まれることが示唆された。A/H1N1では、A/H3N2の方よりもHA遺伝子の遺伝子進化速度が遅いことが示唆された。遺伝子再集合は多いとされるA/H3N2だけではなくA/H1N1でも見られた。なお、抗原と関連する変化は日本よりも早期に見られ、熱帯・亜熱帯における通年のサーベイランスによるインフルエンザウイルス遺伝子の検索は、新しい抗原性を持つウイルスをいち早く検出できる可能性を強く示唆した。

以上、今回の研究は皆無に等しい熱帯亜熱帯地域のウイルス遺伝子特性に関する貴重な情報を得た点に、学位論文としての価値を認める。