

2004-2007 年台灣地區 A 型流感病毒 抗原表現與表面蛋白基因演化分析

邱淑君、張慧文、吳思慧、林智暉

疾病管制局研究檢驗中心

摘要

流行性感冒病毒(簡稱流感病毒)的基因突變會對病毒的抗原性產生不同程度之影響，流感病毒重要胺基酸位點的基因變異導致抗原性改變對於是否造成全球性的大流行扮演相當關鍵的角色。在過去的一些研究中發現血球凝集素(Haemagglutinin)、神經胺酸酶(Neuraminidase gene)等表面蛋白基因組成改變可嚴重影響流感病毒的抗原表現。持續監測這些基因及其抗原的變異情形，對掌握流感病毒的流行動態以及在決定每年流感病毒疫苗株的選取上，提供了相當重要且關鍵的資訊。為了瞭解台灣地區流感病毒基因的變異情形，評估台灣爆發本土性大流行的可能性，本研究將對台灣流感病毒分離株進行表面蛋白之基因定序，並藉由生物資訊的分析技術，瞭解臺灣地區流感病毒基因序列演變與抗原表現間可能的關係，同時藉由內部基因 MP 的序列分析，瞭解監測期間台灣地區 A 型流感病毒對抗病毒藥物金剛胺(Amantadine)之抗藥性產生情形，以供作為治療用藥的參考。

關鍵字：A 型流感病毒、抗原性、序列分析、台灣

- 西元 2009 年 1 月 20 日受理
- 西元 2009 年 4 月 9 日接受刊載
- 通訊作者：邱淑君
- 聯絡地址：台北市南港區昆陽街 161 號
- e-mail：schiu@cdc.gov.tw



前 言

流感病毒依病毒核蛋白(NP)及基質蛋白(MP)抗原特性及其基因特徵的不同，共分 A、B、C 三型，其中 A 型流感病毒曾在人類史上造成數次的大流行。流感病毒具有套膜(envelope)以及八個分節的單鏈負股 RNA 基因體，由於以 RNA 為模板的 RNA 複製酶的不具校正功能，因而產生基因突變，進而發生胺基酸組成的變異，造成病毒抗原性或抗藥性或毒性的改變[1]。流感病毒因其基因快速變異，以及表面抗原持續變化而引起每年不同流感病毒的流行；而流感病毒的分子演化分析研究，不但可提供季節性分離株基因變異的相關資訊，也可作為初估季節性流行幅度的依據。

A 型流感病毒可依其表面抗原 HA 及 NA 蛋白將之次分型。目前全球流行的主要型別為 H1N1 以及 H3N2 型，台灣近年也以此二型為主。流感病毒之抗原性判定是依據血球凝集抑制法對其表面蛋白 HA 進行抗原性偵測，若病毒對疫苗株的抗血清反應效價下降(稱為 low reactor)，顯示病毒的抗原性發生改變，將導致人體施打疫苗後免疫系統產生之抗體對新病毒的辨識能力下降，提高病毒致病甚至造成流行的可能。國際上目前研究流感病毒的演化與分類主要是以 HA 基因為主，然而病毒的變異不僅只在 HA 基因出現，其他如神經胺酶(NA)與其他內部基因(internal genes)在病毒重組片段交換的機率與 HA 基因也很相似，且內部基因單一位點的改變也可能導致流感病毒致病力或抗藥性的增加[2-4]，因此，本研究除針對 2004-07 年台灣地區的 A 型流感分離株，進行表面抗原 HA、NA 基因的序列分析，瞭解近年臺灣地區 A 型流感病毒的演化，並分析抗原表現與病毒基因演化間的關聯性。

材料與方法

病毒培養及抗原鑑定：

本研究所分析的病毒為 2004-07 年間台灣地區所分離的 A 型流感病毒共計 902 株，利用本局與中研院所研發已公開發表之 grouping 軟體進行序列分組後[5]，依照其抗原表現、分離時間以及分離地區等條件，選出共計 54 株代表病毒株進行分析，其中 19 株為 A/H1N1 型流感病毒株，35 株為 A/H3N2 型流感病毒株。所有病毒均接種於 MDCK 細胞進行增殖培養，3-5 天之後收集病毒液並利用世界衛生組織所提供之流感病毒鑑定試劑組(WHO Influenza Diagnostic Reagent Kit)進行紅血球凝集抑制反應(Hemagglutinin Inhibition, HI Test)鑑定流感病毒抗原性，所有操作程序均依照試劑組中所建議的操作方式進行[6]。

流感病毒基因片段增幅反應及基因定序：

病毒核酸是用 QIAGEN 的 QIAamp viral RNA Kit 進行萃取。以 QIAGEN one-step RT-PCR 試劑組進行 HA、NA 以及 MP 片段的核酸複製反應，操作程序均依照試劑組建議進行。反應條件為 50°C 30 分鐘，95°C 15 分鐘，之後以 95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 60 秒條件進行 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘進行最終延長。反應完成後用 ABI 3130xl sequence analyzer 進行核酸序列的分析。以 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 試劑組進行定序，以 95°C 5 秒、60°C 4 分鐘進行 25 個循環的反應。之後以 100%酒精沉澱後風乾，再將反應產物溶於 HiDi-Formamide 後，注入 96 孔反應盤上機定序。

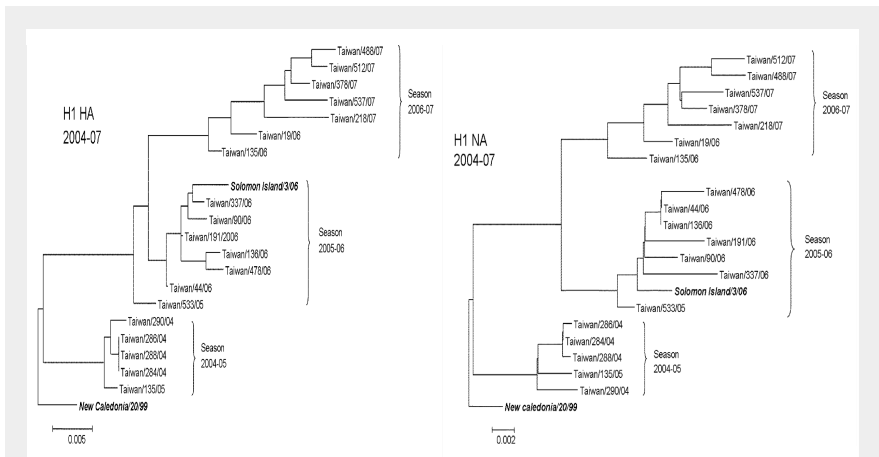
序列分析：

所有病毒核酸序列以 MEGA 4.1 軟體進行排比及演化分析，並以 Neighbor-joining method 分析法，Bootstrap 次數為 1000 次進行 Phylogenetic Tree 的繪製[7]。

結果

(1) H1N1 型流感病毒：

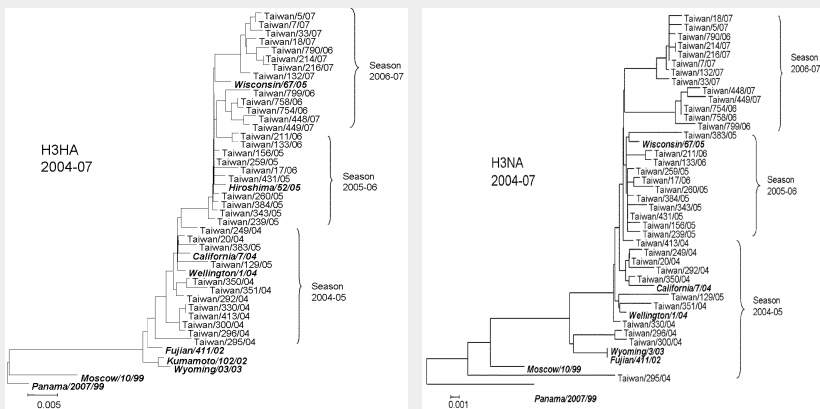
A/H1N1 型流感病毒 HA 基因以包含 HA1 全長的 1193bp(核苷酸位置：1-1193)片段進行分析，NA 基因則分析全長序列 1413bp(核苷酸位置：1-1413)。分析結果顯示，2004-07 年間的 A/H1N1 型流感病毒的表面抗原基因均隨著其被分離出的季節而呈現單一方向的演化。分析內部胺基酸組成，發現 2004-05 年分離株在胺基酸序列與當年疫苗株 A/New Caledonia/20/99 有 169A、255R 以及 256F 等胺基酸位點的變異。2005-06 年分離株則較前一流行季增加 81R、101H、269N 等變異，2006-07 年分離株則又增加了 144E、192M、197K 等胺基酸位點的變異。而 NA 基因經排比後，發現與 A/New Caledonia/20/99 相較有 48I 的胺基酸位點變異。而 2005-06 年分離株與 A/New Caledonia/20/99 相較有 64N 以及 265T 等位點的變異。2006-07 年分離株則有 130K、213G、266M 等位點變異。基因演化如圖一所示。



圖一、2004-07 年 A/H1N1 型流感病毒表面抗原基因演化樹的分析。其中粗斜體是 WHO 建議的疫苗株

(2) H3N2 型流感病毒：

A/H3N2 型流感病毒 HA 基因以包含 HA1 全長的 1178bp(核苷酸位置：7-1184)片段進行序列分析，NA 基因則分析全長共 1407bp(核苷酸位置：1-1407)。分析結果顯示，2004-07 年間的 A/H3N2 型流感病毒的表面抗原基因的演化方向也與其被分離出的時間相符。比對基因序列與抗原性表現，發現 2004-05 年 A/H3N2 流感病毒的 HA 基因與其抗原性的表現相似，可分為兩群，分別與 2003-04 年疫苗株 A/Wyoming/3/03 以及與 2004-05 年疫苗株 A/California/7/04 相近。進一步比較胺基酸組成發現，California-like 比 Wyoming-like 分離株多出一個 227P 位點變異。2005-06 年分離株則增加 193F 以及 225N 的變異，其中又有約 1/3 的分離株具有 50E 的變異。2006-07 年分離株比前一季增加 142G 以及 144D 兩個胺基酸位點的改變，其中部分分離株另有 173E 的變異。分析 A/H3N2 型流感病毒 NA 基因發現，2006-07 年的分離株的基因表現可明顯分成兩群，其中一群有 370S、387K 等位點改變，而另一群則發生 86K、335G 等位點改變。基因演化如圖二所示。



圖二、2004-07 年 A/H3N2 型流感病毒表面抗原基因演化樹的分析。其中粗斜體為 WHO 建議的疫苗株



討 論

2004-07 年 A 型流感病毒由於抗原性的改變，WHO 建議之北半球 A/H3N2 疫苗株由 A/Wyoming/3/03 變為 A/California/7/04，再變為 A/Wisconsin/67/05，至 2008-09 年建議疫苗株又再變為 A/Brisbane/10/07-like。1999-2006 年的 A/H1N1 疫苗株 A/New Caledonia/20/99 亦在 2006-07 年變為 A/Solomon Island/3/06，至 2008-09 年變為 A/Brisbane/59/07-like，顯示近年來的 A 型流感病毒不論是在 A/H1N1 或是 A/H3N2 型別，其變異情形均非常頻繁。然而有些許基因變化並不會改變病毒胺基酸的組成，因此不會明顯影響流感病毒抗原性的表現。這些所謂的“silent mutation”在抗原性的測定上並不會產生明顯變化，然而病毒核苷酸變異的偵測，卻能提供病毒演化上相當重要的資訊。

2004-07 年 H1N1 型流感病毒：

2005-06 年在台灣地區流感流行季的主要分離株型別為 A/H1N1。在抗原的表現上可分為與 A/New Caledonia/20/99 相似以及與 A/New Caledonia/20/99 有 4 倍或以上抗原性差異的兩群。抗原性表現與 A/New Caledonia/20/99 相似的分離株，胺基酸序列與 A/New Caledonia/20/99 比對結果有包括 81R 及 169A 兩個胺基酸改變。而抗原性與 A/New Caledonia/20/99 有 HI titer 四倍以上差異的分離株，比對胺基酸位點發現與 A/New Caledonia/20/99 除了 81R、169A 以外，另有 92S 及 94G 等兩個分別位於不同抗原決定位上的位點變異。由過去的研究顯示，流感病毒抗原性發生改變至少在 HA 蛋白上要有 2 個以上的抗原決定位發生胺基酸的改變[8]。因此，抗原性與 A/New Caledonia/20/99 有 HI titer 四倍或以上差異的分離株，可能胺基酸變異在影響病毒抗原性的表現上扮演重要的角色。

2006-07 年台灣地區 A 型流感病毒的流行型別雖以 H3N2 型為主，但仍有約 30 株的零星 A/H1N1 病毒株被分離出，其中大約有 85%

的分離株都與 A/New Caledonia/20/99 疫苗株有 HI titer 四倍以上抗原性差異，而這些分離株與 A/Solomon Island/3/06 疫苗株均有 144E 的胺基酸變異，第 144 胺基酸的位置靠近 Ca2 抗原決定位，發生變異可能會影響抗原性表現。此外我們還發現部分分離株比 A/Solomon Island/3/06 又多了 192M 及 197K 等變異，其中第 192 胺基酸位於抗原決定位上，第 197 位點則靠近受器結合位，這些胺基酸改變均有可能影響病毒的抗原性。

在 NA 基因的部份，分析 2004-07 年 A/H1N1 型流感病毒的序列發現，2005-06 年不同的兩群病毒株，其抗原表現不同，但在 NA 胺基酸組成上卻完全相同，而比起 2004-05 年的分離株多了三處胺基酸位點的變異。另外，2008 年的疫苗株 A/Solomon Island/3/06 其 NA 序列組成與 2005-06 年分離株完全相同，這樣的結果可以顯示台灣的病毒較 WHO 的疫苗株提前了二到三年出現。近年研發出一種抑制流感病毒藥物 Tamiflu，就是以 A 型及 B 型流感病毒的 NA 為主要的作用對象，由於作用效果良好，更被世界衛生組織列為在爆發 H5N1 疫情時的建議用藥。研究顯示當病毒 NA 胺基酸序列 274 位置轉變為 Y 時，會對 Tamiflu 產生抗藥性[9]。分析台灣地區 2004-07 年的 A/H1N1 分離株 NA 序列結果並未發現具有 274Y 變異的分離株，顯示在監測期間並未發現台灣的 A/H1N1 型流感病毒對 Tamiflu 產生抗藥性。此結果亦可顯示，最近全球關注的流感抗性病毒株，在台灣是在 2008 年才開始出現的。

2004-07 年 A/H3N2 型流感病毒：

台灣地區 2004-07 年之間，A/H3N2 型流感病毒一直持續活躍，全國各地整年均可分離出 A/H3N2 型流感病毒。2004-05 年台灣地區流感病毒型別主要以 A/H3N2 為主[10]，分離株依其抗原表現可為兩群，分別與 2003-04 年疫苗株 A/Wyoming/3/03 以及 2004-05 年的疫苗株



A/California/7/04 相似。A/Wyoming/3/03 與 A/California/7/04 的抗原性彼此間雖有 HI 效價四倍的差異，但仍具保護力。2005-06 年分離株較前一季多了 193F 以及 225N 兩個位點的變異，其中又有約 1/3 的分離株具有 50E 的變異，這些位點分別位於受器結合位及抗原決定位上，具有這些變異的分離株對 A/California/7/04 有 4 倍 HI 的抗原性差異。然而，對 2006-07 年疫苗株 A/Hiroshima/52/05 抗血清卻有很好的 HI 效價，顯示這三個胺基酸位點的改變會影響病毒的抗原性。至於 2006-07 年分離株中有高達 62% 的分離株對 A/Hiroshima/52/05 抗血清呈現 HI 效價四倍以上差異，比對其胺基酸序列時，發現比 A/Hiroshima/52/05 多了 142G、144D 胺基酸位點變異，其中部分分離株還另有 173E 位點的變異，這三個位置也都位於抗原決定位上。整體而言，2004-07 年台灣的 A/H3N2 型流感病毒持續在演化且多數都是抗原決定位發生變化。根據過去的研究顯示 A/H3N2 流感病毒的 HA 基因中某些胺基酸位點具有高度的不穩定性，數年便會發生胺基酸組成的改變[11]。這些胺基酸位點的改變與抗原性間的相關研究成果，均有助於日後病毒分子演化與抗原性表現的監測與分析，並成為重要的參考依據。

而本研究在分析 A/H3N2 型流感病毒的 NA 基因時，發現 2004-05 年分離株的演化情形很類似 2005-06 年台灣地區流行的 A/H1N1 型流感病毒。雖具有抗原性差異，但其 NA 基因的胺基酸序列卻完全相同，顯示 HA 與 NA 兩個因基的演化並非同時，而是各自獨立進行演化。由於 A 型流感病毒的特殊遺傳物質組成，造成其基因不穩定性，抗流感病毒藥物的研發常趕不上病毒的突變速度。由研究顯示，H3N2 病毒 NA 片段的胺基酸序列若發生包含 274Y、119G/A/D/V 等位點變異，病毒均會對 Tamiflu 產生抗藥性[9]。分析 2004-07 年台灣地區 A/H3N2 型流感分離株結果顯示病毒仍未發現對 Tamiflu 產生抗藥性。然而在鄰近台灣的許多國家已有病毒株對 Tamiflu 產生抗藥性，造成治療上

的困難。目前國際旅遊日漸頻繁，將提供病毒發生基因交換重組的機會，可能使抗藥性的情形日趨嚴重。

此外，本研究也發現 2004-07 年台灣 A/H3N2 型流感分離株 M2 基因具有 31N 位點變異的株數持續增加，到 2006 年幾乎達 100%，與全球監測的趨勢相同[12]。M2 蛋白所形成的離子通道(ion channel)可讓病毒釋放遺傳物質到寄主細胞中，抗病毒藥物 Amantadine 便作用於 M2 通道，可阻斷病毒遺傳物質的釋放。當 A 型流感病毒的 M2 胺基酸組成若發生 27A、30T、31N 等位點變異，就會對 Amantadine 產生抗藥性，而位點變異與抗藥性關聯之實測資料亦於近期研究中獲得佐證[12,13]。台灣許多的分離株均含有 31N 位點的變異，亦表示台灣的 A/H3N2 病毒有部份是具抗藥性的病毒株，比對抗藥性病毒株的其他內部基因序列發現，這些分離株的 PA 基因均有 101G、256Q 以及 421V 胺基酸位點的變化，顯示 A/H3N2 病毒的 MP 與 PA 基因間可能具有某些相當程度的關聯性，需要更進一步的分析研究。

結 論

台灣地區 2004-07 年 A 型流感病毒在抗原性的表現與其基因序列分析結果顯示，A 型流感病毒的抗原表現與表面蛋白 HA 胺基酸位點的變化具有相當程度的關聯，本研究分析所獲得的變異位點，值得後續密切注意其變化情形。另外雖然在 2004-07 年間所分離的 A 型流感病毒仍未發現對 Tamiflu 產生抗藥性，但對 Amantadine 具抗藥性的比例卻愈來愈高，且抗藥性分離株的 MP 基因與其他基因相關聯的表現，亦需要進一步去對病毒蛋白結構以及毒性表現深入分析。至於防疫策略上是否要仿照美國疾病管制局對社會大眾提出暫時停止使用金剛胺藥物(Amantadine derives)的方式[13]，應由相關政策單位廣邀醫學界專業人士研商因應對策。



參考文獻

1. Webster R, Bean W, Gorman O, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:152-79.
2. Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, et al. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature* 2008;453:615-9.
3. Holmes EC, Ghedin E, Miller N, et al. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biol* 2005;3:1579-89.
4. Steel J, Lowen AC, Mubareka S, et al. Transmission of influenza virus in a mammalian host is increased by PB2 amino acids 627K or 627/701N. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000252. Epub 2009 Jan 2.
5. Liao YC, Lee MS, Ko CY, et al. Bioinformatics models for predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 virus. *Bioinformatics*. 2008;24:505-12.
6. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ. Concepts and Procedures for Laboratory-Based Influenza Surveillance. WHO. 1982.
7. Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;24:1596-9.
8. Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol* 1990;8:737-17.
9. Yen HL, Hoffmann E, Taylor G, et al. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *J Virol* 2006;80:8787-95.
10. Lin JH, Chiu SC, Shaw MW, et al. Characterization of the epidemic influenza B viruses isolated during 2004-2005 season in Taiwan. *Virus Res* 2007;124:204-11.
11. Nakajima K, Nobusawa E, Tonegawa K, et al. Restriction of amino acid change in influenza A virus H3HA: comparison of amino acid changes observed in nature and *in vitro*. *J Virol* 2003;77:10088-98.
12. Bright RA, Medina MJ, Xu X, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 2005;366:83-95.
13. Bright RA, Shay DK, Shu B, et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA* 2006;295:891-4.