

季節性インフルエンザウイルスにおけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出

(2007/08, 2008/09シーズン)

長島 真美, 新開 敬行, 原田 幸子, 尾形 和恵, 吉田 勲, 長谷川 道弥,
岡崎 輝江, 保坂 三継, 貞升 健志, 甲斐 明美

**Detection of an Oseltamivir Resistance Gene Mutation in Seasonal Influenza Viruses Isolated
during the 2007–2009 Influenza Seasons in Tokyo**

Mami NAGASHIMA, Takayuki SHINKAI, Sachiko HARADA, Kazue OGATA, Isao YOSHIDA,
Michiya HASEGAWA, Terue OKAZAKI, Mitsugu HOSAKA, Kenji SADAMASU and Akemi KAI

季節性インフルエンザウイルスにおけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の検出

(2007/08, 2008/09シーズン)

長島真美*, 新開敬行*, 原田幸子*, 尾形和恵*, 吉田勲*, 長谷川道弥*,
岡崎輝江*, 保坂三継*, 貞升健志**, 甲斐明美***

新型インフルエンザ対策において、オセルタミビル耐性遺伝子変異の調査は極めて重要である。我々は、NAタンパク質の275位のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換された部位(H275Y)を含むアミノ酸変異を検出する方法として、RT-nested PCR法およびシーケンスを用いた方法を開発した。この方法を用いて東京都内で分離されたインフルエンザウイルス191株を調査したところ、2008/09シーズンに分離されたA/H1N1亜型ウイルスの64株すべてでH275Yのアミノ酸がみられた。一方、2007/08シーズンに分離されたA/H1N1亜型ウイルスの84株、2008/09シーズンに分離されたA/H3N2亜型ウイルス26株およびB型ウイルス17株では、オセルタミビルによる耐性変異は認められなかった。東京都では新型インフルエンザ対策として、400万人分のオセルタミビルおよびザナミビルを備蓄しており、今後も都内における薬剤耐性変異の調査を継続していく必要がある。

キーワード: インフルエンザ, ノイラミニダーゼ阻害剤, オセルタミビル耐性遺伝子, アミノ酸変異 H275Y

はじめに

インフルエンザウイルスは、その内部タンパク質の抗原性の違いからA, B, Cの三種類に分類され、A型インフルエンザはさらにHemagglutinin (HA) 型で16種類、Neuraminidase (NA) 型で9種類の亜型に分類されている¹⁾。近年は、A/H1N1亜型、A/H3N2亜型およびB型の3種類のヒトインフルエンザウイルスが流行を繰り返している。

現在認可されている抗インフルエンザ薬には、M2イオンチャンネル阻害剤²⁾ (アマンタジン, リマンタジン) とノイラミニダーゼ阻害剤³⁾ (オセルタミビル, ザナミビル) の二種類がある。M2イオンチャンネル阻害剤はA型インフ

ルエンザにのみ有効とされ、ノイラミニダーゼ阻害剤はA型およびB型インフルエンザに有効とされている。

2007年11月以降から、NAタンパク質の275位のアミノ酸がヒスチジン (H) からチロシン (Y) に置換され、オセルタミビルに対し耐性能を有するA/H1N1亜型ウイルスの出現が世界各地から報告され、ノルウエーの67%を筆頭にEU諸国全体でも20%以上の頻度で検出されるようになった⁴⁾。その後、オセルタミビル耐性のA/H1N1亜型ウイルスは急速に世界各国に広がり、2009年3月現在、発生頻度はアメリカでは97%、EU諸国では98%、オーストラリアでは80%と報告されている⁵⁾。

Table 1. Primer used for Conventional PCR

Type/Subtype	Name	Primer Sequence (5'→3')	Position	Length (bp)	
A/H1N1	RT/1st	NA1-1	AgA CAA Tgg AgC Tgt ggC Tg	594-613	425
		NA1-2	CAG TCA CTg gAT TgC AgC Tg	1018-999	
	2nd	NA1-3	TAA AAT ACA Acg gAA TAA TAA CTg	617-640	363
		NA1-4	gCg gAT TgT CAC CgA ACA C	979-961	
A/H3N2	RT/1st	NA3-1	gCC CCA AAC TAg CAg AAT AC	233-252	806
		NA3-6	ACC ACC TTC TTC ATT gTT Agg	1038-1018	
	2nd	NA3-2	CTT gCT Tgg TCC CCA gAT g	260-279	746
		NA3-8	gCT ACT gCT ggA gCT gTC g	1005-987	
B	RT/1st	BNA-1	ACC TTT TAT TgC TTg Tgg ACC	404-425	495
		BNA-2	gCA AAT CCg CAT gTg CAT TC	898-879	
	2nd	BNA-3	gCA AAC ACT TTg CTC TAA CCC	434-454	423
		BNA-4	gTT ggA AAT TCT TTT ATT ATT C	856-835	

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

*** 東京都健康安全研究センター微生物部

わが国は世界のオセルタミビル生産量の70%以上を使用しており、薬剤の選択圧による耐性株の出現が危惧されていた。また東京都においては、新型インフルエンザ対策の一環として抗インフルエンザ薬の備蓄を行っており^{6,7)}、オセルタミビル耐性ウイルスの流行状況の把握は、重要な課題となっている。

そこで、オセルタミビル耐性遺伝子変異の検出法を開発し、感染症発生動向調査および集団かぜの調査で搬入された検体から分離されたヒトインフルエンザウイルス株について調査を行ったので報告する。

材料および方法

1. 供試試料

2008/09シーズンに東京都で分離されたA/H1N1亜型64株、A/H3N2亜型26株およびB型17株を対象とした。また、A/H1N1亜型については2007/08シーズンに分離された84株についても併せて解析を行った。

2. 供試試料からのRNA抽出

ヒトインフルエンザウイルスによる細胞変性効果を生じたMDCK細胞培養上清200 μ L からSepaGene RV-R (三光純薬) を用いて遺伝子抽出を行い、最終産物を滅菌蒸留水30 μ L に再溶解したものをRNA抽出液とした。

3. RT-nested-PCR法

Montら⁸⁾らの報告を参考に、NA領域をコードする遺伝子領域の薬剤耐性変異部位を検出するプライマーを設定し、検出に用いた (表1)。

標的遺伝子の増幅は以下の手順で行った。RNA抽出液3 μ L, 1st PCRに使用するプライマーペア (各0.5 μ M) およびOmmscript RT Kit (QIAGEN) を用いて、37°Cで60分間反応させ、cDNA 10 μ L を作成した。cDNA作成後、10 \times Ex Taq Buffer (TaKaRa) 4.0 μ L, 2.5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Mixture (TaKaRa) 4.0 μ L, 1st PCRプライマー混合液0.5 μ L, 5U/ μ L TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) 0.25 μ L, 滅菌蒸留水 31.25 μ L およびcDNA10 μ Lを混合し、[94°C1分, 53°C2分, 72°C2分]のサイクルを30回繰り返した (1st PCR反応)。その後、10 \times Ex Taq Buffer 5.0 μ L, 2.5 mM dNTP Mixture 4.0 μ L, 2nd PCRプライマー混合液1.0 μ L, 5U/ μ L TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) 0.25 μ L, 滅菌蒸留水 36.75 μ L および1st PCR産物3.0 μ Lを混合し、[94°C1分, 53°C2分, 72°C2分]のサイクルを30回繰り返した (2nd PCR反応)。

4. ダイレクトシーケンス法

標的遺伝子が増幅されたPCR反応産物を2.5%低融点ゲル (Nusieve GTG Agarose : CAMBREX Bio Science) で電気泳動し、紫外線照射下で特異バンドを切り出した。その後、ヒートブロックを用いて低融点ゲルを溶解し、QIAquick

PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて低融点アガロースゲルから遺伝子精製を行い、DNA液30 μ Lを得た。

シーケンシング反応には、2nd PCR反応に用いたプライマーを使用し、各プライマー3.2 μ M 1.0 μ L, Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing 試薬 (Applied Biosystems ; ABI) 4.0 μ L, 5 \times Buffer (ABI) 2.0 μ L, 滅菌蒸留水8.0 μ L およびDNA液5.0 μ Lを混合し、[94°C15秒, 50°C15秒, 60°C4分]のサイクルを25回繰り返した。

シーケンシング反応産物の精製はCentri-Sep Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用い、ドライアップ後、Hi-Di Formamide 25 μ Lに再溶解し、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (ABI) を用いて塩基配列を決定した。

5. 薬剤耐性変異の解析

得られた塩基配列を基に遺伝子解析ソフトMEGA4を用いて系統樹解析⁹⁾およびアミノ酸配列の比較を行った。NA領域における薬剤耐性変異の有無についてはMontら⁸⁾およびSheuら¹⁰⁾の報告を参考に、A/H1N1亜型ではH275Yの他にS248G, G249R, I267Vを、A/H3N2亜型では、E119V, D151V, Q226H, G248R, K249E, R292Kを、B型ではR152K, D198E, I222Tのアミノ酸変異を対象に調査を行った。

結果及び考察

1. A/H1N1亜型ウイルス

2007/08シーズンおよび2008/09シーズンに都内で分離された株について系統樹解析を行ったところ、2008/09および2009/10シーズンワクチン株 (A/Brisbane/59/2007) と同じ

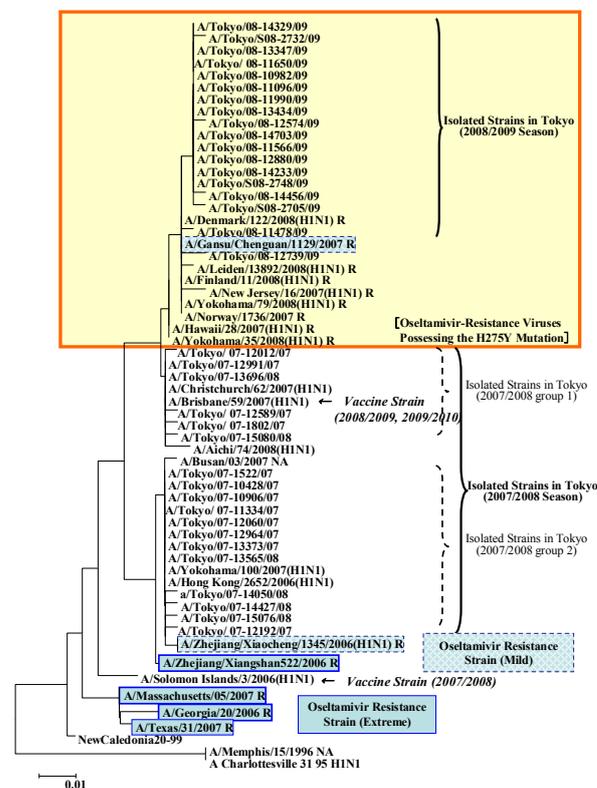


Fig 1. Phylogenetic Tree of NA Genes of Influenza A Viruses (A/H1N1) <2007-2009 Influenza Season>

Table 2. Oseltamivir Resistance mutations Detected in Culture Specimens* <2007/2009 Influenza Season>

NA Mutation	A/H1N1		NA Mutation	A/H3N2	NA Mutation	B
	2007/2008	2008/2009		2008/2009		2008/2009
H275Y	0/84	64/64	E119V	0/26	R152K	0/17
S248G	0/84	0/64	D151V	0/26	D198E	0/17
G249R	0/84	0/64	(D151G)	(1/26)	I222T	0/17
(G249K)	(22/84)	(64/64)	(D151N)	(2/26)		
I267V	0/84	0/64	Q226H	0/26		
			G248R	0/26		
			K249E	0/26		
			R292K	0/26		

* : Date are the Positive Number / Total Number

クラスターに分類された (Fig. 1). 2007/08シーズン分離株は、2008/09シーズン分離株と別々のクラスターを構成し、さらに2つのクラスターに分かれた。また、国内分離株でH275Yの変異を持つウイルスは、海外で報告されているオセルタミビルに強い耐性を持つ株と明らかに別のクラスターに分布した。

薬剤耐性変異の有無について調査したところ、2007/08シーズンに分離された84株すべてにH275Yアミノ酸変異はみられなかった。一方、2008/09シーズンに分離された64株では、すべての株でH275Yの変異が認められた (Table 2.)。また、両シーズンを通して、S248G、G249RおよびI267Vの変異は認められなかった。薬剤に起因する変異であるか不明であるが、2007/08シーズンの22株および2008/09シーズンの64株すべてにおいて、グリシン (G) からリジン (K) に変異していた。

国立感染症研究所が行った国内調査^{11,12)}によると、2007/08シーズンにH275Yアミノ酸変異が認められた分離株の発生頻度は2.6%だったにもかかわらず、2008/09シーズンの発生頻度は99.6%であった。都内分離株でも同様の結果が見られ、全国的にH275Yアミノ酸変異を認める分離株が大勢を占めていることが示唆された。

2. A/H3N2亜型ウイルス

2008/09シーズンに都内で分離された株について系統樹解析を行ったところ、2008/09および2009/10シーズンのワクチン株 (A/Uruguay/716/2007) と同じクラスターに含まれ、分離株はさらに大きく4つのサブグループに分類された (Fig. 2.)。

薬剤耐性変異の有無について調査したところ、26株すべてでE119V、D151V、Q226H、G248R、K249E、R292Kのアミノ酸変異は認められなかったが、151位のアミノ酸がアスパラギン酸 (D) からグリシン (G) に変異している株が1株、Dからアスパラギン (N) に変異している株が2株あった (Table 2.)。D151G/DまたはD151Nの変異を持つ株は、ザナミビルに対する薬剤感受性能の低下が知られており¹⁰⁾、この3株にザナミビルに対する薬剤感受性の低下を有する

可能性が示唆された。

3. B型ウイルス

B型インフルエンザウイルスは、B/Yamagata/16/88に代表される山形系統とB/Vicoria/2/87に代表されるVictoria系統に分類される。系統樹解析を行ったところ、2008/09シーズンに都内で分離された17株のうち、2株は山形系統に、15株はVictoria系統に分類された (Fig. 3.)。

薬剤耐性変異の有無について調査したところ、17株のすべてにR152K、D198E、I222Tのアミノ酸変異は認められなかった (Table 2.)。

国立感染症研究所が行った国内調査^{11,12)}によれば、B型インフルエンザウイルスで薬剤耐性変異を認める株は検出さ

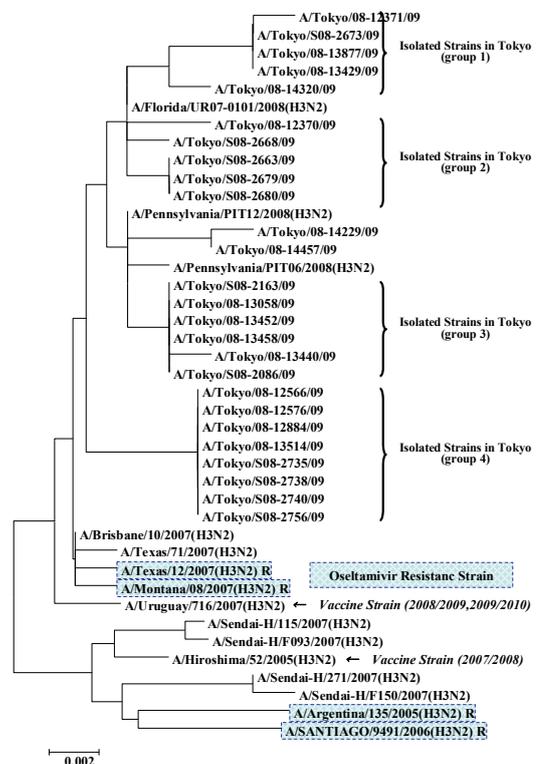


Fig 2. Phylogenetic Tree of NA Genes of Influenza A Viruses (A/H3N2) <2008/2009 Influenza Season>

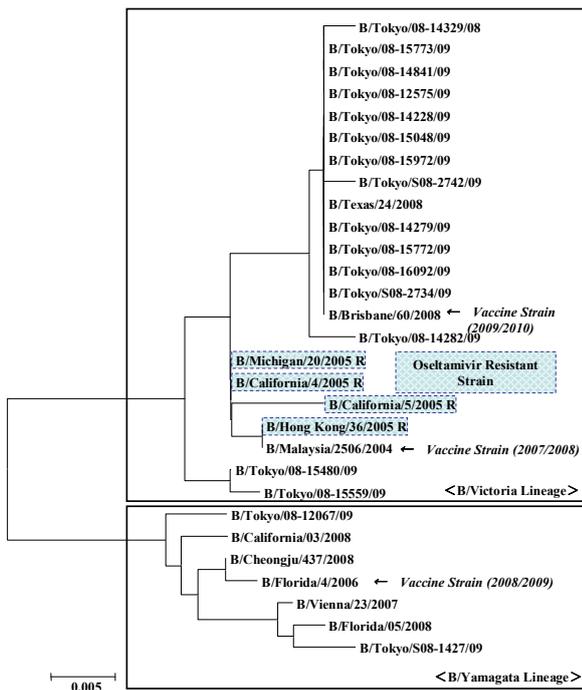


Fig 3. Phylogenetic Tree of NA Genes of Influenza B Viruses <2008/2009 Influenza Season>

れておらず、我々の調査結果においても、都内分離株と同様の結果が得られた。都内で分離されたB型ウイルスのほとんどがVictoria系統であったこと、また、報告されている薬剤耐性ウイルスはVictoria系統であること¹⁰⁾から、今後、耐性変異が検出される可能性があり、継続的な調査の必要性が示唆された。

国立感染症研究所の報告¹¹⁾によると、2007/08シーズンに全国で分離されたA/H1N1亜型ウイルスのうちのオセルタミビル感受性株240株に対するNAI薬剤感受性試験の結果、薬剤感受性株のオセルタミビルに対する50%NA活性阻害濃度 (IC₅₀) の平均値は0.09 nMであった。一方、H275Yの耐性マーカーを持つ耐性株のオセルタミビルに対するIC₅₀値は概ね33.0 nM以上を示し、薬剤感受性株のIC₅₀平均値に比べて300倍以上もオセルタミビルに対して感受性が低下していた。また、2008/09シーズンに分離されたオセルタミビル耐性株は、2007/08シーズンに分離された感受性株に比べて、400倍以上も高いIC₅₀値を示したと報告されている¹²⁾。これらの情報からすると、2008/09シーズンに都内で分離されたH275Y変異株も、オセルタミビル感受性株に比べ同程度の薬剤感受性の低下があると類推される。

一方、Sheuら¹⁰⁾の報告によると、2007年10月から2008年3月にアメリカで検出されたオセルタミビルに強い耐性を持つA/H1N1亜型ウイルスのIC₅₀値は、85.08 nMから255.83 nMである。今後の国内分離株の動向を注意深く見守っていく必要がある。

東京都は、新型インフルエンザ対策として、400万人分のオセルタミビルおよびザナミビルの備蓄を行っており、今後の動向を探る上でも、薬剤耐性変異の調査は必要不可欠であり、今後とも継続して実施していく必要があると考える。

まとめ

オセルタミビル耐性遺伝子変異の検出法を開発し、東京都内で分離されたインフルエンザウイルス株について調査を行った。

A/H1N1亜型ウイルスでは、2007/08シーズンに分離された84株すべてにH275Yアミノ酸変異はみられなかった。一方、2008/09シーズンに分離された64株では、すべての株でH275Yの変異が認められた。

2008/09シーズンに分離されたA/H3N2亜型ウイルス26株およびB型ウイルス17株にオセルタミビル耐性変異はみられなかった。

文献

- 1) Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., *et al.*: *J. Virol.*, **79**, 2814-2822, 2005.
- 2) Davies, W.L., Grunert, R.R., Haff, R.F., *et al.*: *Science*. **144**, 862-863, 1964.
- 3) Hayden, F.G.: *Phil Trans R Soc Lond B.*, **356**, 1877-1884, 2001.
- 4) http://ecdc.europa.eu/en/Health_topics/influenza/antivirals_graph.aspx (2009年8月10日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 5) http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1_table/en/index.html (2009年8月10日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 6) 東京都: 東京都新型インフルエンザ対策行動計画, <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/iryu/kansen/influenza/files/influ.pdf> (2009年8月10日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 7) 東京都: 新型インフルエンザ対応マニュアル, http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/iryu/kansen/influenza/files/influ_manyual.pdf (2009年8月10日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 8) Monto, A.S., McKimm-Berschkin, J.L., Macken, C., *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2395-2402, 2006.
- 9) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., *et al.*: *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 596-1599. 2007.
- 10) Sheu, T.G., Deyde, V.M., Okomo-Adhiambo, M., *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3284-3292, 2008.
- 11) 国立感染症研究所: インフルエンザ(A/H1N1)オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況, 病原微生物検出情報, **29**, 334-339, 2008.
- 12) 国立感染症研究所: 2008/09シーズンにおけるインフ

ルエンザ(A/H1N1)オセルタミビル耐性株 (H275Y) の 国内発生状況, 病原微生物検出情報, 30, 101-106, 2009.

Detection of an Oseltamivir Resistance Gene Mutation in Seasonal Influenza Viruses Isolated during the 2007–2009 Influenza Seasons in Tokyo

Mami NAGASHIMA*, Takayuki SHINKAI*, Sachiko HARADA*, Kazue OGATA*, Isao YOSHIDA*,
Michiya HASEGAWA*, Terue OKAZAKI*, Mitsugu HOSAKA*, Kenji SADAMASU* and Akemi KAI*

Surveillance of oseltamivir-resistant influenza viruses is very important for designing countermeasures against pandemic influenza. We developed a method based on RT-nested-PCR and sequencing to detect and analyze oseltamivir resistance gene mutations, including a histidine to tyrosine amino acid change at position 275 (H275Y). We analyzed 191 amino acid sequences of neuraminidase from seasonal influenza viruses (A/H1N1, A/H3N2, and B) isolated during the 2007–2009 winter seasons in Tokyo. All of the 64 influenza A/H1N1 viruses isolated in the 2008/2009 influenza season had the H275Y mutation; however, 84 of the A/H1N1 viruses isolated in the 2007/2008 influenza season and 43 of the other types (A/H3N2 and B) did not have any mutations related to oseltamivir. The Tokyo Metropolitan Government has already stored 400 million treatment doses of oseltamivir and zanamivir against pandemic influenza. In the future, we will continue to conduct surveys on drug-resistant influenza viruses in Tokyo.

Keywords: influenza virus, neuraminidase inhibitor, oseltamivir resistant gene, amino acid change, H275Y

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan