

新型インフルエンザウイルスA/H1N1pdm2009における
オセルタミビル耐性遺伝子変異の検出

長島 真美，新開 敬行，原田 幸子，高野 智香，塚本 良治，尾形 和恵，
吉田 勲，長谷川 道弥，岡崎 輝江，林 志直，貞升 健志，甲斐 明美

Detection of an Oseltamivir Resistance Gene Mutation in Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses Isolated in Tokyo

Mami NAGASHIMA, Takayuki SHINKAI, Sachiko HARADA, Chika TAKANO,
Ryouji TSUKAMOTO, Kazue OGATA, Isao YOSHIDA, Michiya HASEGAWA,
Terue OKAZAKI, Yukinao HAYASHI, Kenji SADAMASU and Akemi KAI

[研究年報 第 61 号 (2010) 正誤表 Errata]

東京健安研セ年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **61**, 121-126, 2010

新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm2009 における

オセルタミビル耐性遺伝子変異の検出

Detection of an Oseltamivir Resistance Gene Mutation in Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses Isolated in Tokyo

Page 126 abstract

[誤 Error]

Using a real-time PCR assay, we tested 156 A/H1N1pdm viruses previously identified by conventional PCR and sequencing, and found that one of the 156 A/H1N1pdm viruses was positive for Y275 and 155 were positive for H275.

[正 Correct]

Using a real-time PCR assay, we tested 116 A/H1N1pdm viruses previously identified by conventional PCR and sequencing, and found that one of the 116 A/H1N1pdm viruses was positive for Y275 and 115 were positive for H275.

新型インフルエンザウイルス A/H1N1pdm2009 における

オセルタミビル耐性遺伝子変異の検出

長島 真美*, 新開 敬行*, 原田 幸子*, 高野 智香*, 塚本 良治*, 尾形 和恵*,
吉田 勲*, 長谷川 道弥*, 岡崎 輝江*, 林 志直*, 貞升 健志**, 甲斐 明美**

オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスのサーベイランス調査は極めて重要である。我々は新型インフルエンザウイルスA/H1N1pdmのオセルタミビル耐性変異の有無を調査する目的で、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（H275Y）されたアミノ酸変異を検出するRT-nested PCR法ーシーケンス法およびreal-time PCR法を用いた方法を開発した。この方法を用いて都内で分離されたA/H1N1pdm株546株を調査したところ、1株にH275Yのアミノ酸変異がみられた。同変異ウイルス1株を含むA/H1N1pdm株116株についてreal-time PCR法を行ったところ、H275Y1株、H275H115株に区別することができた。

キーワード： 新型インフルエンザ, A/H1N1pdm, 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, RT-nested PCR 法ーシーケンス法, real-time PCR 法

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¹⁾されている。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た。しかし 2009 年 4 月に、これまでの A/H1N1 株と抗原性が異なるブタ由来の新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm)²⁾がメキシコ、北米を中心に発生し、その後日本を含む世界各地に感染が広がった。

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³⁾ (アマンタジン, リマンタジン) とノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤⁴⁾ (オセルタミビル, ザナミビル, ペラミビル) 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、NA

阻害剤は A 型および B 型インフルエンザに有効である。A/H1N1pdm 株は M2 イオンチャンネル阻害剤に耐性であるため、WHO は A/H1N1pdm の治療薬として NA 阻害剤を推奨している⁵⁾。

世界各地で分離されている A/H1N1pdm 株のほとんどは、オセルタミビルおよびザナミビルに対して感受性がある⁶⁾が、2009 年 6 月以降、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/H1N1pdm の出現が日本をはじめ世界各地から報告されている⁷⁾。

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^{8,9)}、オセルタミビル耐性ウイルスの流行状況の把握は、新型インフルエンザ対策の重要な課題となっている。

Table 1. Primer Pairs and Fluorogenetic Probes used for Conventional PCR and Real-time PCR

		Name		Sequence (5'→3')								
Conventional PCR	RT/1st	swNA1-1	AgA	CAA	Tgg	AgC	AgT	ggC	Tg			
		swNA1-2	ACg	ACA	CTg	gAT	TAC	AAC	Tg			
	2nd	swNA1-3a	TAA	AgT	ACA	ACg	gCA	TAA	TAA	CAg		
		swNA1-4	Tgg	ATT	gTC	TCC	gAA	AAT				
Real-time PCR		swNA-F4	AAg	ATA	gTC	AAA	TCA	gTC	gAA	ATg	AAT	g
		swNA-R4	CAC	TAg	AAT	CAg	gAT	AAC	Agg	AgC	AT	
		swNA-H4P	FAM-	CTC	ATA	gTg	ATA	ATT	Agg	-MGB		
		swNA-Y4P	VIC-	CCT	CAT	AgT	AAT	AAT	TAg	g-MGB		

* 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

そこで、A/H1N1pdm におけるオセルタミビル耐性遺伝子変異の高感度検出法を開発し、感染症発生動向調査等で搬入された検体から分離された A/H1N1pdm 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. 供試材料

2009/2010シーズンに東京都で分離されたA/H1N1pdm株546株を対象とした。

2. 供試材料からのRNA抽出

A/H1N1pdm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QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて遺伝子抽出を行い、RNA抽出液70 μ Lを作製した。

3. RT-nested-PCR法

NA タンパク質をコードする遺伝子領域の薬剤耐性変異部位を含む 362 bp を増幅するプライマーを設定し、検出に用いた (Table 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混合液 0.5 μ L および Omniscript 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 cDNA 10 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シング法

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 (ライフテクノロジー ジャパン) 4.0 μ L, 5 $\times$ Buffer (ライフテクノロジー ジャパン) 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 (ライフテクノロジー ジャパン) 25 μ L に再溶解し、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (ライフテクノロジー ジャパン) 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 を用いた系統樹解析¹⁰⁾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 H275Y に加え、国立感染症研究所の報告¹¹⁾を参考に I223R を、Bloom ら¹²⁾の報告を参考に R222Q, V234M を対象に調査を行った。

6. real-time PCR法用標準DNAの作製

real-time PCR法用の標準DNAとして、NAタンパク質をコードする遺伝子領域に設定したプライマーおよびプローブの塩基配列を含む合成鎖DNAを作製した (ファスマックに合成依頼)。凍結乾燥品をTE溶液 (10 mM Tris-HCl, pH8.0 ; 1 mM EDTA, pH8.0) (ナカライテスク) で溶解後、10倍段階希釈を行い、 3.0×10^6 copies/ μ L から0.3 copies/ μ L までの10倍段階希釈系列を作製した。

7. real-time PCR法

Chutinimitkul ら¹³⁾や Bolotin ら¹⁴⁾の報告を参考に、NA タンパク質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および TaqMan MGB プローブを設定し、検出に用いた (Table 1.)。プライマーおよびプローブの設定には、Primer Express v2.0 (ライフテクノロジー ジャパン) を用いた。



Fig. 1. Phylogenetic Tree of NA Gene of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses

Table 2. Oseltamivir Resistance Related Mutations of the Viruses isolated in Tokyo

NA Mutation	Positive Number / Total Number	(%)
H275Y	1/546	0.2%
I223R	0/546	0.0%
(I223V)	(0/546)	0.0%
(I223T)	(1/546)	0.2%
(N222Q)	(0/546)	0.0%
(V234A)	(1/546)	0.2%

標的遺伝子の検出は以下の手順で行った。RNA抽出液 (または標準DNA液) 3 μ L, 各プライマー100 μ M 0.25 μ L, 各プローブ10 μ M 0.25 μ LおよびQuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い反応量25 μ L とし, 50°C40分, 95°C15分反応させた後, [94°C15秒, 60°C1分15秒] のサイクルを45回繰り返した。なお検出機器としてABI fast-real time PCR 7900HT (ライフテクノロジー・ジャパン) を使用した。

反応前後に蛍光強度の測定を行い, 薬剤耐性変位の有無を判定した。

結果及び考察

1. NA遺伝子系統樹解析による薬剤耐性変異の解析

2009/2010 シーズンに都内で分離された A/H1N1pdm 株 546 株について NA 遺伝子の系統樹解析を行ったところ, 2009/10 シーズンのワクチン株 (A/California/07/2009) と同じクラスターを構成し, 545 株はさらに 4 つのグループに分かれた。1 株は 4 つのグループに属さず, 大阪をはじめ海外で報告されているオセルタミビル耐性変異株と同じクラスターに分類された (Fig 1.)。

薬剤耐性変異の有無について調査したところ, 解析した 546 株のうち系統樹解析によりオセルタミビル耐性変異株と同じクラスターに属した株 1 株 (0.2%) に H275Y の変異が認められた (Table 2.)。H275Y に加え I223R の変異を持つ A/H1N1pdm 株の検出¹¹⁾や, H275Y に加え I223V の変異を持つ A/H1N1pdm 株の検出^{15,16)}も報告されている。今回 I223R, I223V の変異は認められなかったが, イソロイシン (I) からスレオニン (T) に変異している株 (I223T) が 1 株あった。さらに, Bloom ら¹²⁾は, 季節性インフルエンザ H1N1 株において H275Y に加えて R222Q, V234M のアミノ酸変異が起こった場合, ウイルスの増殖能が維持されると報告している。A/H1N1pdm 株の 222 位のアミノ酸はアルギニン (R) ではなくアスパラギン (N) であるが, すべての株でグルタミン (Q) への変異はみられなかった。また, 234 位のアミノ酸がバリン (V) からアラニン (A) に変異している株 (V234A) は 1 株みられた。

国立感染症研究所が行った国内調査¹¹⁾によると, 2009/10 シーズンに H275Y アミノ酸変異が認められた分離株の検出頻度は 1.13%であった。国内調査に比べ都内分離株での検出頻度は 0.2%とやや低い, 国内調査には薬剤投与後に

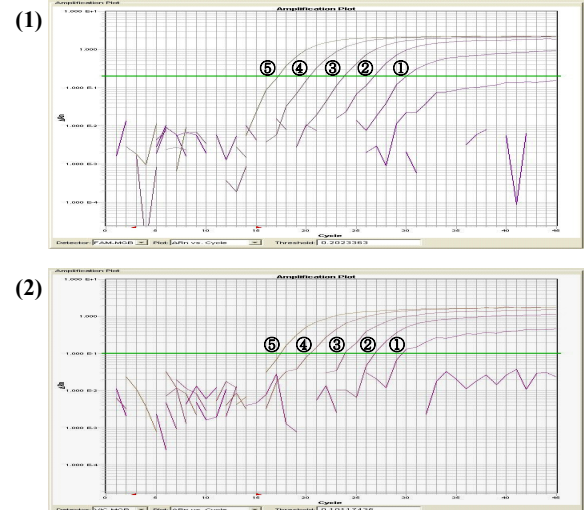


Fig. 2. Establishment of the Standard Curve for Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses Quantification by Real-time PCR

Amplification plots of oseltamivir-susceptibility viruses possessing the H275 (1) and oseltamivir-resistance viruses possessing the Y275 (2) standards. Genome concentrations are 9.0×10^2 (1), 9.0×10^3 (2), 9.0×10^4 (3), 9.0×10^5 (4), 9.0×10^6 (5) copies/tube from right to left.

検体採取された症例や薬剤を投与したものの症状が改善しないなど臨床的に薬剤耐性が疑われたケースも含まれているため, 国内調査の検出頻度は実際の検出頻度よりも少し高い数値である可能性がある。季節性インフルエンザ H1N1 株と同様, 今後も耐性変異ウイルスが流行することも懸念されるため, 継続的な調査の必要性が示唆された。

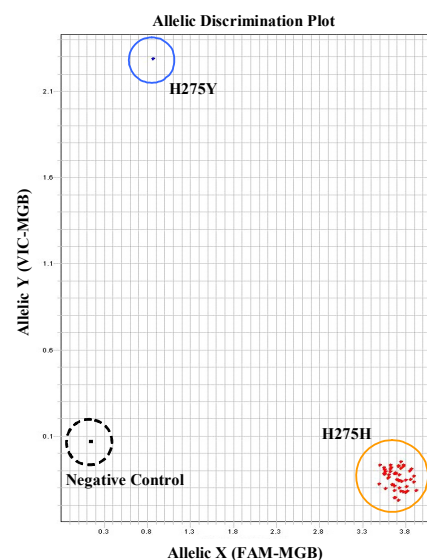


Fig. 3. Results of TaqMan Probe PCR-based drug resistance genotyping using Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses

A FAM-MGB-labeled probe was used to detect H275-alleles (Allele 1); a VIC-MGB-labeled probe was used to detect Y275-alleles (Allele 2)

2. real-time PCR法を用いた薬剤耐性変異の検出

real-time PCR法の検出感度について、10倍段階希釈した標準DNAを用いて検討した結果、H275H検出用およびH275Y検出用とも 9.0×10^2 copies/tube から 9.0×10^6 copies/tubeの範囲内において、サイクル数に比例しDNA量の増幅曲線が得られ、検出感度はともに 9.0×10^2 copies/tubeと推定された (Fig 2.)。

2009/10シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm株のうち、RT-nested PCR法—シーケンス法でH275Yのアミノ酸変異がみられた1株を含むA/H1N1pdm株116株についてreal-time PCR法を用いて薬剤耐性変異の検出を行い、薬剤耐性変異の有無を判定した。その結果、感受性株115株はすべて感受性株と判定され、耐性変異株1株は耐性株と判定され、系統樹解析による結果と一致した (Fig 3.)。

real-time PCR法を用いた薬剤耐性変異の検出は一度に多数検体の検出が可能であり、系統樹解析による薬剤耐性変異の解析よりも短時間で解析することができる。しかし、対象となる耐性変異の有無の判定しかできないため、新たな薬剤耐性変異部位が出現した場合には、改めて検出系の開発が必要となる。このため、系統樹解析による解析と併用していくことが望ましいと考えられる。

3. H275Y薬剤耐性変異株

都内で分離されたH275Yオセルタミビル耐性マーカーを有するA/H1N1pdm分離株 (A/Tokyo/S09-1256/2009pdm) の薬剤感受性試験を国立感染症研究所で行った結果、都内で分離されたA/H1N1pdm分離株 (感受性株) に比べて344倍高いIC50値を示し、オセルタミビルに対して耐性であることが確認された。また、ザナミビルに感受性であることも確認されている。検体採取はザナミビル投与前に行われており、オセルタミビル耐性能の獲得と薬剤投与との関係は不明である。

国立感染症研究所の報告¹¹⁾によると、2009/2010シーズンに全国で分離されたA/H1N1pdm株のうち、H275Yオセルタミビル耐性マーカーを有するA/H1N1pdm分離株について、オセルタミビルに対する感受性試験を行った結果、感受性株に比べて平均で約350倍高いIC50値を示し、オセルタミビルに対する感受性が著しく低下していた。同じ耐性マーカーを有する季節性A/H1N1耐性株のIC50値も感受性株に比べ400倍以上高い値であったと報告¹⁷⁾されており、都内では臨床的に薬剤の服用が問題になった例がほとんどなかったことから、A/H1N1pdm耐性株の薬剤感受性がどの程度のものなのか、今後フォローアップしていく必要がある。

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いる。これらの薬剤の有効性など今後の動向を探る上でも、都内で分離されたインフルエンザウイルスに対する薬剤耐性変異の調査は必要不可欠であり、今後も継続して行っ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A/H1N1pdm株546株について調査を行ったところ、1株にH275Yアミノ酸変異が認められた。

real-time PCR法を用いて、H275Yのアミノ酸変異がみられた1株を含むA/H1N1pdm株116株のアミノ酸耐性変異を調査したところ、感受性株115株はすべて感受性株と判定され、耐性変異株1株は耐性株と判定された。

文献

- 1) Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., *et al.*: *J. Virol.*, **79**, 2814-2822, 2005.
- 2) Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., *et al.*: *Nature*, **459**, 1122-1126, 2009.
- 3) Davies, W.L., Grunert, R.R., Haff, R.F., *et al.*: *Science*, **144**, 862-863, 1964.
- 4) Hayden, F.G.: *Phil Trans R Soc Lond B*, **356**, 1877-1884, 2001.
- 5) WHO: WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza and other Influenza Viruses, http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/index.html (2010年7月22日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 6) Garten, R.J., Davis, C.T. Russell, C.A., *et al.*: *Science*, **325**, 197-201, 2009.
- 7) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **30**, 270, 2009.
- 8) 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/iryo/kansen/influenza/files/influ.pdf> (2010年7月22日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 9) 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/iryo/kansen/influenza/files/influ_manyual.pdf (2010年7月22日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 10) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., *et al.*: *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 596-1599, 2007.
- 11) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **31**, 173-178, 2010.
- 12) Bloom, J.D., Gong, L.I., Baltimore, D.: *Science*, **328**, 1272-1275, 2010.
- 13) Chutinimitkul, S., Suwannakarn, K., Chieochansin, T., *et al.*: *J Virol. Methods*, **139**, 44-49, 2007.
- 14) Bolotin, S., Robertson, A.V., Eshaghi, A., *et al.*: *J Virol. Methods*, **158**, 190-194, 2009.
- 15) Deyde, V.M., Sheu, T.G., Trujillo, A.A., *et al.*: *Antimicro. Agents Chemother*, **54**, 1102-11110, 2010.
- 16) CDC: "Oseltamivir-Resistant 2009 Pandemic Influenza A

(H1N1) Virus Infection in Two Summer Campers
Receiving Prophylaxis – North Carolina, 2009", *MMWR*,
58, 969-972, 2009.

17) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報, **30**, 101-106,
2009.

Detection of an Oseltamivir Resistance Gene Mutation in Pandemic Influenza A/H1N1 2009 Viruses Isolated in Tokyo

Mami NAGASHIMA*, Takayuki SHINKAI*, Sachiko HARADA*, Chika TAKANO*,
Ryouji TSUKAMOTO*, Kazue OGATA*, Isao YOSHIDA*, Michiya HASEGAWA*,
Terue OKAZAKI*, Yukinao HAYASHI*, Kenji SADAMASU*, and Akemi KAI*

Surveillance of oseltamivir-resistant influenza viruses is very important for designing countermeasures against pandemic influenza. We developed 2 methods based on conventional polymerase chain reaction (PCR) and sequencing and real-time PCR to detect and analyze oseltamivir resistance genetic mutations, including a histidine to tyrosine amino acid change at position 275 (H275Y). We analyzed 546 amino acid sequences of neuraminidase from the pandemic influenza A/H1N1 2009 viruses (A/H1N1pdm) isolated in Tokyo. One of the 546 A/H1N1pdm viruses contained the H275Y mutation related to oseltamivir. Using a real-time PCR assay, we tested 156 A/H1N1pdm viruses previously identified by conventional PCR and sequencing, and found that one of the 156 A/H1N1pdm viruses was positive for Y275 and 155 were positive for H275. 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: pandemic influenza virus, neuraminidase inhibitor, oseltamivir resistant gene, amino acid change, H275Y, conventional-PCR-sequencing, real-time PCR

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