

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
(2010–2011シーズン)

長島 真美, 新開 敬行, 原田 幸子, 吉田 勲, 尾形 和恵,
長谷川 道弥, 林 志直, 貞升 健志, 甲斐 明美

**Detection of an Oseltamivir Resistance Gene Mutation in Influenza Viruses Isolated
during the 2010–2011 Influenza Season in Tokyo**

Mami NAGASHIMA, Takayuki SHINKAI, Sachiko HARADA,
Isao YOSHIDA, Kazue OGATA, Michiya HASEGAWA,
Yukinao HAYASHI, Kenji SADAMASU and Akemi KAI

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 (2010-2011シーズン)

長島 真美^a, 新開 敬行^a, 原田 幸子^a, 吉田 勲^a, 尾形 和恵^a,
長谷川道弥^a, 林 志直^a, 貞升 健志^b, 甲斐明美^b

インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異を調査する目的で、新たにA/H3N2亜型 (E119V) およびB型 (R152K) 変異検出用のreal-time PCR法を開発した。先に開発したA/H1N1pdm09亜型のオセルタミビル耐性変異の検出法を併用して、2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm09亜型 (151株), A/H3N2亜型 (75株) およびB型 (55株) を調査したところ、A/H1N1pdm09亜型2株にH275Yのアミノ酸変異が認められた。

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, アミノ酸変異, H275Y, E119V, R152K, 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。2009 年 4 月に、新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm09)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。2010 年春には流行の収束がみられ、その後の大きな流行はなく、2010-2011 シーズンは、A/H1N1pdm09 亜型、A/H3N2 亜型および B 型の混合流行がみられた。

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/H1N1pdm09 亜型は M2 イオンチャンネル阻害剤に耐性であるため、WHO は A/H1N1pdm09 亜型の治療薬として 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/H1N1pdm09 亜型株のほとんどは、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⁾。しかし、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) に置換された (H275Y)、オセルタミビルに対し耐性能を有する A/H1N1pdm09 亜型株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 Fluorlogenetic Probes used for Conventional PCR and Real-time PCR

Type/Subtype	Name	Sequence (5'→3')	Position	
A/H3N2	Real-time PCR	N2-E119V-F2a Agg ATT TgC ACC TTT TTC TAA ggA	285-308	
		N2-E119V-R2a TCC AAg ggC AAA TTg ATA ACA CT	405-383	
		N2-E119-2P FAM- ACA CAT AAg gTT CTC TTg T-MGB	367-349	
		N2-V119-2P VIC- CAC ATA Agg TAC TCT TgT -MGB	366-349	
A/H3N2	Conventional PCR	RT/1st	NA3-1 gCC CCA AAC TAg CAg AAT AC	233-252
			NA3-6 ACC ACC TTC TTC ATT gTT Agg	1038-1018
		2nd	NA3-3a ggt CAA AgC CgC AAT gTg AC	260-280
			NA3-8 gCT ACT gCT ggA gCT gTC g	1005-987
B	Real-time PCR	B-R152K-F3 CCC ATT ATg CAg CTC AAC CA	398-417	
		B-R152K-R3 TTg CCC AAT TTg ACT gAA ATT AgA	488-465	
		B-R152-3P FAM- AgC TTg TTT CTg TCT TC -MGB	458-442	
		B-K152-3P VIC- AgC TTg TTT TTg TCT TC -MGB	458-442	

^a 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

^b 東京都健康安全研究センター微生物部
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

これまでに筆者らは、オセルタミビル耐性遺伝子変異の検出方法を開発し報告してきた¹⁰⁾。また前報¹¹⁾では、A/H1N1pdm09亜型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について報告した。今回、A/H3N2亜型およびB型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確立し、感染症発生動向調査ならびに東京感染症アラートにおいて搬入された検体から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ので報告する。

材料および方法

1. 供試材料

2010-2011シーズンに東京都でMDCK細胞により分離されたA/H1N1pdm09亜型151株、A/H3N2亜型75株およびB型55株を対象とした。

2. 供試材料からのRNA抽出

各MDCK細胞培養上清140 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、使用時まで-80°Cにて保存した。

3. 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。

4. real-time PCR法およびAllelic Assay

A/H1N1pdm09 亜型については、既報¹¹⁾のプライマーおよび TaqMan MGB プローブを検出に用いた。A/H3N2 亜型および B 型については、Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network (NISN) の報告¹²⁾を参考に A/H3N2 亜型は E119V を、B 型は R152K を調査対象とした。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 および Primer Express v3.0 (ライフテクノロジー ジャパン) を用いた。

標的遺伝子の検出は既報¹¹⁾に従い実施した。すなわち、RNA抽出液(または標準DNA液) 3 μ Lを用い、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を使用し(最終反応量25 μ L)、A/H1N1pdm09亜型およびA/H3N2亜型の場合には、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。B型の場合には、50°C40分、95°C15分反応させた後、[94°C15秒、62°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。real-time PCR反応の前後に蛍光強度の測定を行い、FAMをX軸に、VICをY軸にそれぞれの蛍光強度差をプロットし、X軸側にプロットされるものを薬剤耐性変異なし、Y軸側にプロットされるものを薬剤耐性変異ありと判定した。

5. RT-nested-PCR法

A/H3N2 亜型のプライマーを一部改変し (Table 1.)、それぞれの薬剤耐性変異部位を増幅できるように設計したプライマーを検出に用い、既報¹⁰⁾に従い標的遺伝子の増幅を行った。すなわち、RNA 抽出液 3 μ L を用い、1st PCR プライマー混合液および Omniscript RT Kit (QIAGEN) を使用して、37°C で 60 分間逆転写反応を行い、cDNA 10 μ L を作成した。cDNA 作成後、1st PCR プライマー混合液および TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を使用して 1st PCR 反応を行った後、1st PCR 産物 3.0 μ L を用い、2nd PCR プライマー混合液および TaKaRa Ex Taq を使用して 2nd PCR 反応を行った。PCR 反応の条件は 1st, 2nd とも [94°C1 分, 53°C2 分, 72°C2 分] のサイクルを 30 回繰り返した。

6. ダイレクトシーケンス法

既報¹⁰⁾に従い実施した。すなわち、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、特異バンドを切り出した後、QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて遺伝子精製を行い、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および Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing 試薬 (ライフテクノロジー ジャパン) を使用し、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、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。

7. 系統樹解析および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 N-J 法による系統樹解析¹⁵⁾およびアミノ酸配列の比較を行った。A/H1N1pdm09 亜型の 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、I223R (国立感染症研究所¹⁶⁾)、I223V (Deyde ら¹⁷⁾および CDC¹⁸⁾)、N295S (Morlighem ら¹⁹⁾) を対象に調査を行った。また、Mont ら²⁰⁾および Sheu ら²¹⁾の報告を参考に、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。

結果および考察

1. real-time PCR法を用いた薬剤耐性変異の検出系の検

討 (A/H3N2亜型ウイルスおよびB型ウイルス)

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、A/H3N2亜型検出系 (E119E検出用, E119V検出用) およびB型検出系 (R152R検出用, R152K検出用) は、いずれも 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、検出感度はいずれも 9.0×10^2 copies/tubeと推定された (Fig 1,2).

反応前後に蛍光強度の測定を行い、X軸にFAM色素の蛍光増加量を、Y軸にVIC色素の蛍光増加量をプロットすると、感受性アミノ酸の標準DNA (E119EおよびR152R) はX軸に沿うよう位置し、耐性変異アミノ酸の標準DNA (E119VおよびR152K) はY軸に沿うように位置し、蛍光強度の差をプロットすることにより薬剤耐性変異の有無を判定することができた (Fig 3).

2.薬剤耐性変異の検出およびNA遺伝子系統樹解析

1) A/H1N1pdm09亜型ウイルス

2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm09亜型151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、H275H : 149株 (98.7%), H275Y : 2株 (1.3%) であった。

また、2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm09 亜株 151株のうち58株について、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調査したところ、解析した58株のうちreal-time PCR法でH275Yと判定された2株にH275Yの変異が確認されたが (Table 2.), I223R/V, N295Sの変

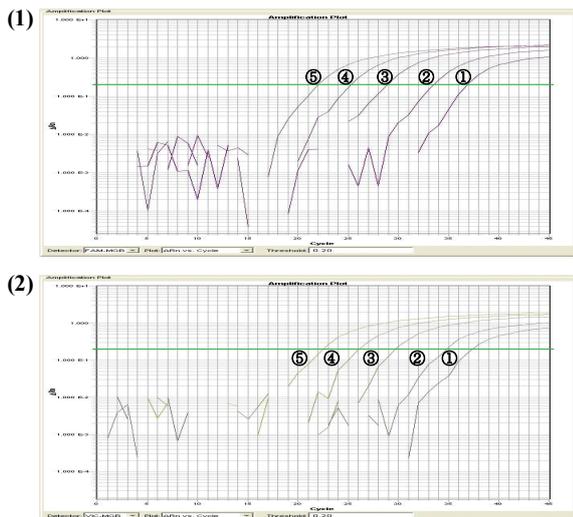


Fig. 1. Establishment of the Standard Curve for Influenza A Viruses (A/H3N2) Quantification by Real-time PCR

Amplification plots of oseltamivir-susceptibility viruses possessing the E119 (1) and oseltamivir-resistance viruses possessing the K152 (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.

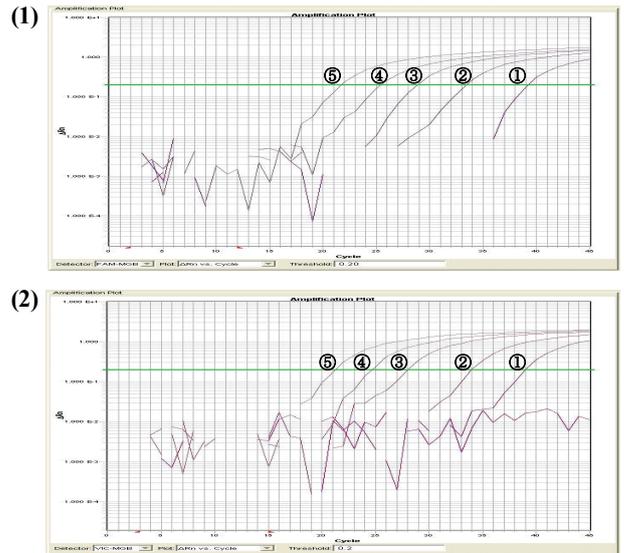


Fig. 2. Establishment of the Standard Curve for Influenza B Viruses Quantification by Real-time PCR

Amplification plots of oseltamivir-susceptibility viruses possessing the R152 (1) and oseltamivir-resistance viruses possessing the K152 (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.

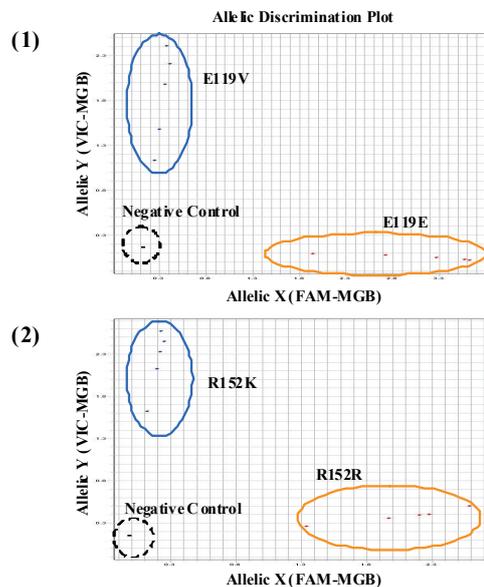


Fig. 3. Results of TaqMan Probe PCR-based drug resistance genotyping

(1) Influenza A/H3N2 Viruses : A FAM-MGB-labeled probe was used to detect E119-allels (Allele X); a VIC-MGB-labeled probe was used to detect V119-allels (Allele Y)
 (2) Influenza B Viruses : A FAM-MGB-labeled probe was used to detect R152-allels (Allele X); a VIC-MGB-labeled probe was used to detect K152-allels (Allele Y)

異は認められなかった。さらに、NA 遺伝子の系統樹解析を行ったところ、分離株 58 株は 2009-2010 および 2010-2011 シーズンのワクチン株 (A/California/07/2009) を含む大きなクラスターを構成し、さらに4つのグループに分かれた (Fig 4.). real-time PCR 法で H275Y と判定された 2

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

NA Mutation	A/H1N1pdm09	NA Mutation	A/H3N2	NA Mutation	B
H275Y	2/58*	E119V	0/46*	R152K	0/23*
I223R/V	0/58	D151V	0/46	D198E	0/23
N295S	0/58	(D151A)	(1/46)	I222T	0/23
		(D151E)	(1/46)		
		(D151G)	(2/46)		
		(D151N)	(2/46)		
		Q226H	0/46		
		G248R	0/46		
		K249E	0/46		
		R292K	0/46		

* : No. of the Positive Strains / No. of the Strains Tested

株は独立したグループ (group4) を形成し、2009-2010 シーズンに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および都内で分離された H275Y オセルタミビル耐性マーカー有する株 (A/Tokyo/S09-1256/2009pdm) とは別のグループに分類された。

国立感染症研究所が行った国内調査²²⁾によると、2010-2011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1.9%であった。国内調査に比べ都内分離株での検出頻度は1.3%とやや低いが、国内調査には薬剤投与後に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。2011年7月現在、オーストラリアやニュージーランド等の南半球諸国では依然としてA/H1N1pdm09亜型が流行しており、今後、耐性変異をもったA/H1N1pdm09亜型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。

2) A/H3N2亜型ウイルス

2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H3N2型75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、75株すべてが



Fig. 4. Phylogenetic Tree of NA Gene of Influenza A Viruses (A/H1N1pdm09)

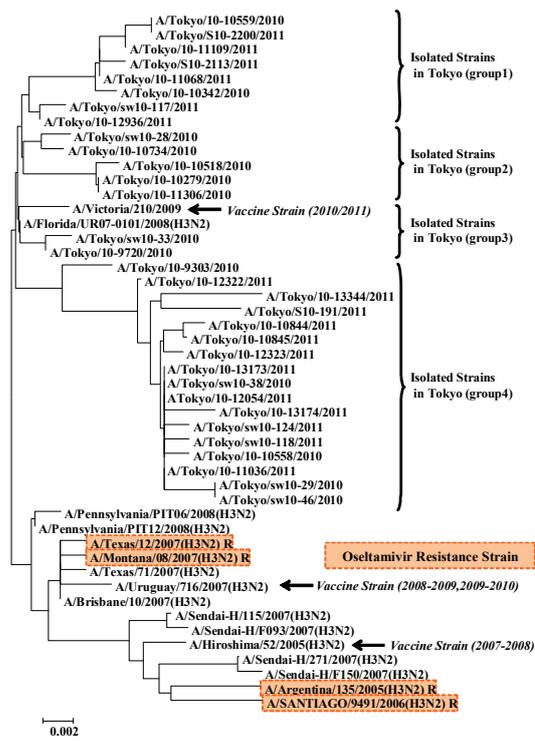


Fig. 5. Phylogenetic Tree of NA Gene of Influenza A Viruses (A/H3N2)

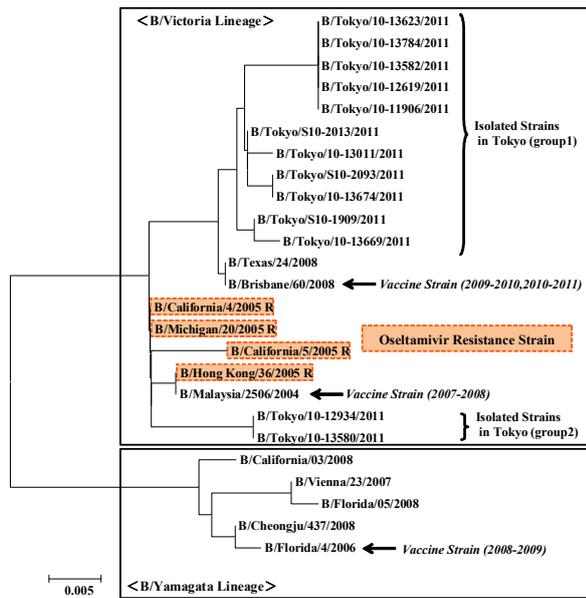


Fig. 6. Phylogenetic Tree of NA Gene of Influenza B Viruses

E119Eであった。

また、2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H3N2型75株のうち46株について、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調査したところ、46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) からアラニン (A) に変異している株 (D151A) が1株、グルタミン酸 (E) に変異している株 (D151E) が1株、グリシン (G) に変異している株 (D151G) が2株、アスパラギン (N) に変異している株 (D151N) 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¹⁹⁾、この4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。2008-2009シーズン都内で分離株でもD151G : 1株, D151N : 2株が検出されており¹⁰⁾、継続的な調査の必要性が示唆された。また、NA遺伝子の系統樹解析を行ったところ、2010-2011シーズンのワクチン株 (A/Victoria/210/009) を含む大きなクラスターに含まれたが、分離株46株はさらに大きく4つのサブグループに分類された (Fig 5.)。

3) B型ウイルス

2010-2011シーズンに都内で分離されたB型55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、55株すべてが R152Rであった。

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/Victoria/2/87に代表されるVictoria系統に分類される。2010-2011シーズンに都内で分離されたB型55株のうち23株について、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調査したところ、23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 3.)。さらに、NA遺伝子の系統樹解析を行ったところ、すべてVictoria系統に分類されたが、2007-2008シーズンのワクチン株

(B/Malaysia/2506/2004) と同じクラスターを構成するグループと、2009-2010および2010-2011シーズンのワクチン株 (B/Brisbane/60/2008) と同じクラスターを構成するグループに分かれた (Fig 6.)。

国立感染症研究所が行った国内調査^{23,24)}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れておらず、我々の調査結果においても、都内で分離株で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¹⁹⁾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。

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/H1N1pdm09 亜型分離株 (A/Tokyo/sw10-96/2011pdmおよびA/Tokyo/10-11203/2011pdm) の薬剤感受性試験を国立感染症研究所に依頼したところ、オセルタミビルに対するIC50値が感受性参照株より240倍および272倍上昇し、オセルタミビルに対する感受性が著しく低下していることが確認された。また、両株ともザナミビルには感受性であることが確認されている。どちらの症例も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。

感染症サーベイランスシステム (NESID) に公開されている2011年4月から6月に行われた「2010/2011シーズン抗インフルエンザ薬剤感受性試験 (A/H1N1pdm09亜型)」の結果によると、薬剤投与前に採取された検体から分離されたH275Yマーカーを有する分離株のオセルタミビルに対するIC50値は、感受性参照株より平均で約335倍上昇しており、全国的に同様の傾向がみられている。また、2009-2010シーズンに全国で分離されたIC50値も感受性株に比べ平均で約350倍高い値であったと報告¹⁶⁾されており、A/H1N1pdm09亜型の薬剤感受性についても引き続き調査していく必要がある。

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、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析による薬剤耐性変異の検出よりも短時間で解析することができる。一方で、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。

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

インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異 (A/H3N2 亜型: E119V, B 型 R152K) の検出法を開発した。先に開発した A/H1N1pdm09 亜型の検出法を加えて、2010-2011 シーズンに都内で分離されたインフルエンザウイルス 281 株を調査したところ、A/H1N1pdm09 亜型 2 株に H275Y のアミノ酸変異がみられた。

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.*: *Scienc*, **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 (2011年7月14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> (2011年7月14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 (2011年7月14日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 10) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他: 東京健安研七
年報, **60**, 61-66, 2009.
- 11) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他: 東京健安研七
年報, **61**, 121-126, 2010.
- 12) Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network : NAI
resistance mutations,
http://www.nisn.org/c_ni_resistance.html (2011年7月14
日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性があ
る)
- 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) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., *et al.*: *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 596-1599, 2007.
- 16) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **31**, 173-
178, 2010.
- 17) Deyde, V.M., Sheu, T.G., Trujillo, A.A., *et al.*:
Antimicrob. Agents Chemother., **54**, 1102-1110, 2010.
- 18) CDC: Oseltamivir-Resistant 2009 Pandemic Influenza A
(H1N1) Virus Infection in Two Summer Campers
Receiving Prophylaxis – North Carolina, 2009, *MMWR*,
58, 969-972, 2009.
- 19) Morlighen, J.E., Aoki, S., Kishima, M., *et al.*: *PLoS ONE* ,
6, e18956, 2011.
- 20) Monto, A.S., McKimm-Berschkin, J.L., Macken, C.,
et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2395-2402,
2006.
- 21) Sheu, T.G., Deyde, V.M., Okomo-Adhiambo, M., *et al.*:
Antimicrob. Agents Chemother., **52**, 3284-3292, 2008.
- 22) 国立感染症研究所: 2009年5月～2011年における抗
インフルエンザ薬剤耐性株 (A/H1N1pdm) 検出情報,
<http://idsc.nih.gov/iasr/influ.html> (2011年7月14日現在,
なお本URLは変更または抹消の可能性はある)
- 23) 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.
- 24) 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 Influenza Viruses Isolated
during the 2010–2011 Influenza Season in Tokyo**

Mami NAGASHIMA^a, Takayuki SHINKAI^a, Sachiko HARADA^a, Isao YOSHIDA^a, Kazue OGATA^a,
Michiya HASEGAWA^a, Yukinao HAYASHI^a, Kenji SADAMASU^a and Akemi KAI^a

Surveillance of oseltamivir-resistant influenza viruses is very important for designing countermeasures against pandemic influenza. Previously, we developed a real-time PCR assay to detect and analyze oseltamivir resistance gene mutations, including a histidine to tyrosine amino acid change at position 275 (H275Y) in pandemic influenza A/H1N1 2009 (A/H1N1pdm09) viruses. In this study, we developed a real-time PCR assay to investigate influenza A/H3N2 viruses possessing E119V and influenza B viruses possessing R152K. We analyzed influenza virus 281 isolates (A/H1N1pdm09, A/H3N2, and B) collected during the 2010–2011 winter seasons in Tokyo. Two of 151 A/H1N1pdm09 viruses contained the H275Y mutation related to oseltamivir resistance. However, 75 A/H3N2 viruses and 55 B viruses did not have any mutations related to oseltamivir resistance. 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, amino acid change, H275Y, E119V, R152K, real-time PCR

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