

## 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索 (2011/2012シーズン)

原田 幸子<sup>a</sup>, 新開 敬行<sup>a</sup>, 長島 真美<sup>a</sup>, 吉田 勲<sup>a</sup>, 尾形 和恵<sup>a</sup>, 長谷川 道弥<sup>a</sup>,  
岡崎 輝江<sup>a</sup>, 林 志直<sup>a</sup>, 甲斐 明美<sup>b</sup>

インフルエンザの治療に用いられる抗インフルエンザ薬には、M2イオンチャネル阻害剤（アマンタジン等）とノイラミニダーゼ阻害剤（オセルタミビル等）の二種類があり、国内では経口投与薬であるオセルタミビルが臨床現場においてよく用いられている。抗インフルエンザ薬耐性変異は、A/H1N1およびA/H1N1pdm09亜型インフルエンザウイルスで過去に都内でも認められており、A/H3N2亜型並びにB型ウイルスについても薬剤耐性変異を獲得したウイルスによる流行が懸念されている。

本研究では、2011/2012シーズンにインフルエンザ定点医療機関より当センターに搬入されたインフルエンザ患者検体から分離されたインフルエンザウイルス株を用いて、ノイラミニダーゼ領域の遺伝子解析を行い、オセルタミビル耐性遺伝子変異を検索した。2011/2012シーズンはA/H3N2、B型の流行であったことから、それぞれ79株、111株について遺伝子検索を行った結果、耐性変異を持ったウイルス株は認められなかった。

**キーワード：**インフルエンザウイルス、オセルタミビル耐性変異、One-Step RT PCR、アミノ酸変異、D151V

### はじめに

インフルエンザウイルスは、抗原性の違いからA、B、C型の三種類の型に大別され、主として冬季に流行を起こすのはAおよびB型インフルエンザウイルスである<sup>1)</sup>。A型インフルエンザウイルスには膜タンパク質として16種類のヘマグルチニン（HA）および9種類のノイラミニダーゼ（NA）があることが知られており<sup>2)</sup>、その組み合わせによってさらに多くの亜型に分類されている。

近年の日本における流行の主流はA/H1N1pdm09亜型（2009パンデミックウイルス）、A/H3N2亜型（香港型）並びにB型ウイルスである。2008/2009シーズンまで流行の主流となっていたA/H1N1亜型（ソ連型）は2009/2010シーズンのA/H1N1pdm09亜型の流行以来、日本での出現は確認されていない。

インフルエンザの治療に用いられる抗インフルエンザ薬にはM2イオンチャネル阻害剤（アマンタジンおよびリマニタジン）とノイラミニダーゼ（NA）阻害剤（ザナミビル、オセルタミビル、ペラミビル、ラニナビル等）の二種類がある<sup>3)</sup>。M2イオンチャネル阻害剤はA型インフルエンザウイルスにのみ有効とされ、NA阻害剤はA型およびB型インフルエンザウイルスの両方に有効である。

抗インフルエンザ薬の中では経口剤で解熱効果があるオセルタミビルがわが国では最も多く使用されており<sup>4)</sup>、日本は世界で最も薬剤の選択圧による変異が起きやすい国と目されてきた。東京都では2007/2008シーズンより薬剤耐性ウイルスの監視をしており<sup>5)</sup>、2008/2009シーズンに流行

したA/H1N1亜型インフルエンザウイルスでは、薬剤耐性変異（H275Y）によりオセルタミビル耐性変異が起きることが明らかにされている<sup>5,6)</sup>。また、2010/2011シーズンに流行したA/H1N1pdm09亜型インフルエンザウイルスでも流行株から薬剤耐性変異（H275Y）が検出されている<sup>7)</sup>。どちらの耐性株も薬剤投与後に起きた変異ではなかったが、繰り返し行われる薬剤の高率使用によっても、インフルエンザウイルスにおける薬剤耐性変異株の出現は危惧されている。

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<sup>8)</sup>、当センターでは、流行株における耐性変異サーベイランスを重点的に実施している<sup>5,7)</sup>。

今回、2011/2012シーズンに感染症発生動向調査等で当センターに搬入され、検体から分離されたA/H3N2亜型およびB型インフルエンザウイルスについて、オセルタミビルに対する薬剤耐性遺伝子変異の有無を調査したので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試材料

2011/2012シーズンに感染症発生動向調査事業、積極的疫学調査事業により搬入された検体より、MDCK細胞を用いて分離されたインフルエンザウイルスA/H3N2亜型79株およびB型111株の計190株を対象とした。なお、2010/2011シーズンまで流行の主流であったA/H1N1pdm09

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

Table 1. Primer Pairs Used for One-Step RT PCR

Type/Subtype		Name	Primer Sequence (5'→3')							Position	Length (bp)
A/H3N2	RT/1st	NA3-3a	ggT	CAA	AAC	CgC	AAT	gTg	AC	260-280	746
		NA3-8	gCT	ACT	gCT	ggA	gCT	gtC	g	1005-987	
B	RT/1st	BNA-3	gCA	AAC	ACT	TTg	CTC	TAA	CCC	434-454	423
		BNA-4	ggA	AAT	ATT	TCT	TTT	ATT	ATT Cgg C	856-835	

亜型は、散発例がわずかに確認されたが、ウイルスは分離されず、2008/2009シーズンを最後に日本でのA/H1N1亜型の発生も見られていないため、今回の解析対象からは除外した。

## 2. RNA抽出One-Step RT PCR

インフルエンザウイルスによる細胞変性効果 (CPE) を認めたMDCK細胞の培養上清140 µLからQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸自動抽出機QIAcube (QIAGEN) によりウイルスの遺伝子抽出を行い、RNA抽出液70 µLを作成し、検査実施まで-80°Cで保存した。

## 3. One-Step RT PCR

NAタンパク質をコードする遺伝子領域上で薬剤耐性変異部位を含む領域 (A/H3N2亜型: 260-1005NA[746bp]およびB型: 434-856NA[423bp]) を増幅できるプライマー<sup>5,7)</sup>を用いた (Table 1)。

RNA抽出液3 µLを用い、One-Step RT PCR kit (QIAGEN) を使用して遺伝子の逆転写とそれに続く増幅反応を行った。すなわち、A/H3N2亜型およびB型ウイルスのNA遺伝子の逆転写反応条件は [56°C30秒, 50°C40分, 95°C15分] であり、続くPCR増幅反応条件は [94°C30秒, A/H3N2亜型56°C30秒, B型55°C30秒, 72°C1分] で、このサイクルを45回繰り返した。

## 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%低融点アガロースゲル (Nusieve GTG Agarose: CAMBREX Bio Science) (以下、低融点ゲル) 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) を用いて遺伝子の精製を行い、DNA液30 µLを得た。

シーケンス反応には3.2 µMのN2亜型プライマー (NA3-3a, NA3-8) またはB型プライマー (BNA-3, BNA-4) を使用した。反応試薬の組成は3.2 µMの各プライマー 1.0 µL, Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing 試薬 (ライフテクノロジーズジャパン) 4.0 µL, 5× Sequencing Buffer (ライフテクノロジーズジャパン) 2.0 µLと、滅菌蒸留水8.0 µLおよびDNA液5.0 µLを混合し、シーケンス反応として [94°C15秒, 50°C15秒, 60秒4分] のサイクルを25回繰り返す条件で反応産物を得た。

シーケンス反応産物の精製は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ズジャパン) 30 µLに再溶解し、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (ライフテクノロジーズジャパン) を用いて塩基配列の読み取りを行った。このデータを元に遺伝子解析ソフトであるChromas-Pro (Technelysium. Pty. LTD) を用いて塩基配列の精査を行い、塩基配列を決定した。

Table 2. Number of having Strains Oseltamivir Resistance Related Mutations Isolated in Tokyo

A/H3N2		B	
NA Mutation	resistant / tested strains	NA Mutation	resistant / tested strains
E119V	0/79	R152K	0/111
D151V	0/79	D198E	0/111
(D151A)	(1/79)	I222T	0/111
(D151E)	(1/79)		
(D151G)	(11/79)		
(D151N)	(24/79)		
Q226H	0/79		
G248R	0/79		
K249E	0/79		
R292K	0/79		

( ): non-resistant mutation

Table 3. Ratio of Amino Acid change strains

Amino Acid change (n=79)	Ratio of Isolated Generation (%)					
	1G	2G	3G	4G	5G	6G
D151G (11)	9.1	18.2	45.5	0.0	0.0	27.3
D151N (24)	8.3	41.7	25.0	0.0	0.0	25.0
D151A (1)	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
D151E (1)	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0
D151 (42)	2.4	21.4	16.7	19.0	28.6	11.9

### 5. 薬剤耐性変異の解析および系統樹解析

得られた塩基配列を基に遺伝子解析ソフトMEGA4<sup>9)</sup>を用いて、近隣接合法 (NJ法) による系統樹解析およびアミノ酸配列の多重比較を行った。

A/H3N2亜型のNA領域における薬剤耐性変異の有無については、Montら<sup>10)</sup>およびSheuら<sup>11)</sup>の報告を参考に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. 薬剤耐性変異の検出およびNAアミノ酸系統樹解析

##### 1) A/H3N2亜型インフルエンザウイルス

2011/2012シーズンに都内で分離されたA/H3N2亜型79株について、薬剤耐性変異の有無について調査した。その結果、79株全てでオセルタミビル耐性に関する領域である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11株、アスパラギン (N) に変異している株 (D151N) が24株認められた (Table 2)。

2010/2011シーズン<sup>7)</sup>と比較すると、グリシン (G) に変異している株が2株から11株 (5.5倍)、アスパラギン (N) に変異している株は2株から24株 (12倍) に変異株の数が増えていた。

151位のアミノ酸が多くの変異を起している点について、継代数との関連を調べた。その結果、151位がアスパラギン酸 (D) のウイルスは三継代目までに40.5%が分離されたのに対し、D151Gのアミノ酸変異を持つウイルスは72.8%、D151Nは75.0%が分離された (Table 3)。このことから、D151GおよびD151Nのアミノ酸変異を持つウイルスは、比較的早期に分離される傾向が認められた。

Dayhoffは、化学的性質の類似したアミノ酸をブロック化し、置換スコア行列を作成している<sup>12)</sup>。これによると、グリシン (G) およびアスパラギン (N) の両変異ともアスパラギン酸 (D) の置換スコア行列の中では変異しやすいアミノ酸であるといえ、両者のアミノ酸変異が大きな構

造変化を引き起こしている可能性は考えにくい。そのため、D151GおよびD151Nのアミノ酸変異を持つウイルスの増殖能力と、このアミノ酸変異の関連性については、引き続き調査の必要があると考えられた。

対象とした全ての株を用いて、NA遺伝子の系統樹解析を行ったところ、2011/2012シーズンのワクチン株 (A/Victoria/210/2009) とは異なるクラスターを形成し、さらに3つのサブクレード (Group1から3) に分類された (Fig. 1)。

#### 2) B型インフルエンザウイルス

2011/2012シーズンに都内で分離されたB型111株について、アミノ酸配列の解析を行い、薬剤耐性変異の有無について調査した。その結果、111株全てにR152K, D198E, I222Tのアミノ酸変異は認められなかった (Table 2)。

これらの株について遺伝子系統樹解析を行ったところ、38株は2008/2009シーズンのワクチン株であるB/Florida/4/2006が含まれる山形系統に分類され、残りの73株が2009-2012シーズンのワクチン株である

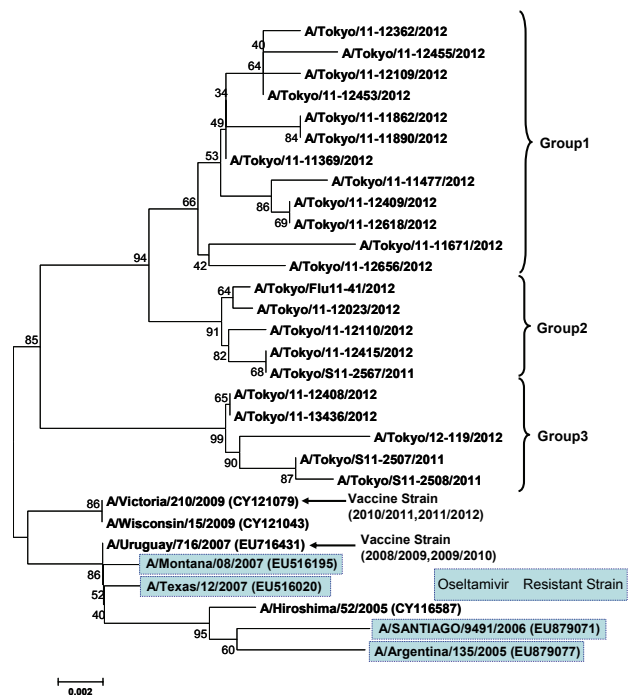


Fig. 1. Phylogenetic Tree of NA Gene of Influenza A Viruses (A/H3N2) isolated in Tokyo

B/Brisbane/60/2008が含まれるVictoria系統に分類された。山形系統の株は全て1つの大きなクラスターを形成し、さらにB/Bangladesh/3333/2007と近縁なサブクレード (Group2) とそうでないサブクレード (Group1) に分類された。Victoria系統の分離株は2009~2012シーズンのワクチン株であるB/Brisbane/60/2008を含む大きな一つのクラスター (Group3) と、1つのサブクレード (Group4) に分類された (Fig. 2)。

国立感染症研究所が行った全国調査<sup>13)</sup>によれば、2011/2012シーズンにA/H3N2並びに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、我々の調査結果と同様の結果が得られた (2012年8月3日現在)。

2011/2012シーズンは2010/2011シーズンまでと異なりA/H1亜型の流行が見られず、A/H3N2およびB型の流行が主流となった。A/H3N2亜型ウイルスでは、D151部位での変異が2010/2011シーズンよりも多くなり、さらにB型では山形系統とVictoria系統の2系統のウイルスが同時に流行したが、Victoria系統の株が優先的に流行した。

A/H3N2亜型ウイルスでは、Sheuら<sup>11)</sup>が報告している薬剤耐性変異に関連する (D151部位) での変異が増えており、Sheuら<sup>11)</sup>によると、D151Nのアミノ酸変異はザナミビルに対して弱い薬剤耐性を示したと報告されている。しかし、日本での薬剤耐性基準にD151Nは示されていないことから、D151部位の変異の傾向については引き続き調査をしていく必要があると考えられた。

また、B型ウイルスでも今後薬剤耐性変異が生じる可能性があることから、B型ウイルスでの継続的な監視の必要性が示唆される。

## ま と め

2011/2012シーズンにウイルス分離された、インフルエンザウイルスのオセルタミビル耐性変異の調査を行った。今シーズンに分離されたウイルスはA/H3N2型79株、B型111株であった。全ての株でオセルタミビル耐性変異は認められなかった。

## 文 献

- 1) 栗村 敬：臨床と微生物 vol.37 (増刊号), 483-487, 2010.
- 2) Knipe. D M., Howley. P M.: *Fields Virology FIFTH EDITION Vol. One*, 1648-1649, 2007.
- 3) Alves Galvão MG., Rocha Crispino Santos MA., Alves da Cunha AJL.: *The Cochrane collaboration.*, John Wiley & Sons, Ltd. 2009.
- 4) 鈴木 宏, 松本 慶蔵 編：インフルエンザの最新知識Q&A2010, 医薬ジャーナル社, 2010.

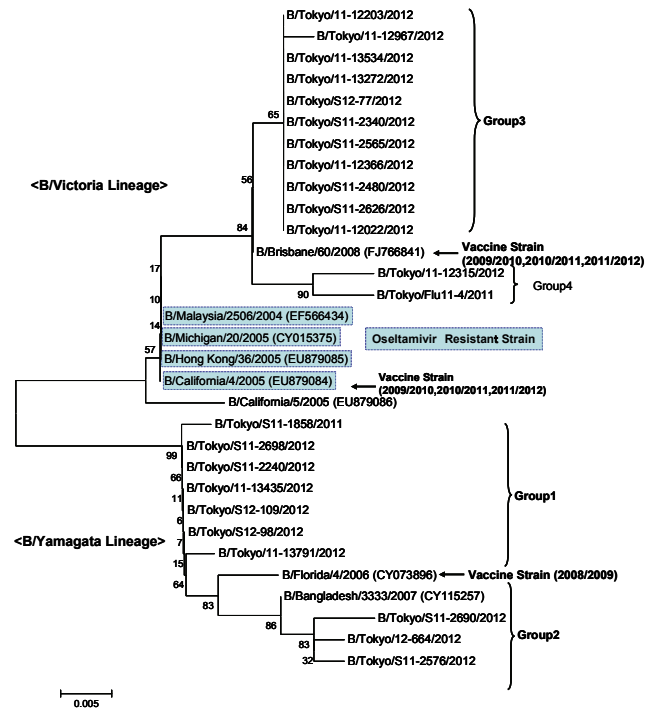


Fig. 2. Phylogenetic Tree of NA Gene of Influenza B Viruses isolated in Tokyo

- 5) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他：東京都健安研七  
年報, **60**, 61-66, 2009.
- 6) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報, **29**, 334-339,  
2008.
- 7) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他：東京都健安研七  
年報, **62**, 57-63, 2011.
- 8) 新型インフルエンザ保健医療体制ガイドライン (概  
要)  
[http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2011/04/DA  
TA/2014j500.pdf](http://www.metro.tokyo.jp/INET/OSHIRASE/2011/04/DA<br/>TA/2014j500.pdf) (2012年9月13日現在、なお本URLは  
変更または抹消の可能性がある)
- 9) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., *et al.*: *Molecular Biology  
and Evolution*, **24**, 596-1599, 2007.
- 10) Monto, A. S., Mckimm-Berschkin, J. L., Macken, C., *et al.*:  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2395-2402, 2006.
- 11) Sheu, T. G., Deyde, V. M., Okomo-Adhiambo, M., *et al.*:  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 3284-3249, 2008.
- 12) 籾 博幸, タンパク質の立体構造入門, 講談社,  
2010.
- 13) 国立感染症研究所：国内のインフルエンザ流行株の高  
原性、遺伝子系統解析および薬剤耐性株の検出状況  
—2011/12シーズン途中経過 (3/21)  
<http://idsc.nih.gov/iasr/rapid/pr3862.html> (2012年8月3  
日現在、なお本URLは変更または抹消の可能性があ  
る)

**Survey of the Oseltamivir Resistance Gene Mutations in Influenza Viruses  
Isolated During 2011–2012 Influenza Seasons in Tokyo**

Sachiko HARADA<sup>a</sup>, Takayuki SHINKAI<sup>a</sup>, Mami NAGASHIMA<sup>a</sup>, Isao YOSHIDA<sup>a</sup>, Kazue OGATA<sup>a</sup>,  
Michiya HASEGAWA<sup>a</sup>, Terue OKAZAKI<sup>a</sup>, Yukinao HAYASHI<sup>a</sup> and Akemi KAI<sup>a</sup>

There are 2 kinds of influenza medicines. One is an M2 ion channel inhibitor (amantadine, etc.), and the other is a neuraminidase inhibitor (oseltamivir, etc.). In Japan, oseltamivir, an oral administration medicine, has been well used by clinics so far. Surveying oseltamivir-resistant influenza viruses is very important in order to detect them at the early stage. A drug-resistant influenza virus had already appeared in 2008. The resistant A/H1N1 virus was varied by natural mutation. Japanese medical clinics use large amounts of oseltamivir to treat influenza. It is possible that oseltamivir-resistant influenza viruses A/H3N2 and B will appear. In this study, we surveyed the drug-resistant influenza viruses A/H3N2 and B. We analyzed 190 influenza virus isolates (A/H3N2 and B) collected during the 2011–2012 winter seasons in Tokyo. We discovered no resistant-variation viruses. Since resistant mutants may arise, it is necessary to continue the surveillance of oseltamivir-resistant influenza viruses in Tokyo.

**Keywords:** influenza virus, neuraminidase inhibitor, oseltamivir resistant

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan