

1. 薬剤耐性インフルエンザウイルスの迅速検出系の構築

○駒込 理佳（北海道立衛生研究所感染症部ウイルスグループ）

1 目的

抗インフルエンザ薬のオセルタミビルは、ザナミビルやラニナミビルなどの吸入薬とは異なり、服用が容易な経口投与製剤である。そのため、インフルエンザ流行の中心となる低年齢層に重要な薬剤として広く使用されている。過去3年間、オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスは散発的にしか検出されていない。しかし、2008/9年シーズンのAH1亜型ウイルスのほとんどがオセルタミビル耐性を獲得していたように、感染力の高い薬剤耐性ウイルスが急速に蔓延する可能性がある。そこで、継続的にオセルタミビル耐性ウイルスサーベイランスを実施し、感染拡大の兆候を監視することが必要である。オセルタミビル耐性は、薬剤の標的であるウイルスのノイラミニダーゼ（NA）遺伝子の変異によって獲得される。AH1pdm09ウイルスについては既に、迅速かつ簡便に耐性変異を検出できるリアルタイムPCR法が確立され、多くのウイルス株を対象に検査を実施してきた。一方、AH3亜型ウイルスでは、手技が煩雑で高価な試薬等を要するダイレクトシーケンス法を用いるため、薬剤耐性検査に供する株数が限られている。そこで、多数の検体を検査して耐性株の流行を迅速に把握するため、AH3亜型ウイルスについても耐性変異を簡便に検出できるリアルタイムPCR法の構築を試みた。

2 方法

1) 陽性コントロールの作成

過去に国内で検出された事がある^{1,2)}、E119V（NAの119番目のアミノ酸がグルタミン酸からバリンに変異）およびR292K（NAの292番目のアミノ酸がアルギニンからリジンに変異）の2カ所のNAの耐性変異迅速検出系の構築を目標とした。耐性変異を持つ陽性コントロールを作成するため、北海道内で分離されたAH3亜型ウイルスのNA遺伝子の全長を組み込んだクローニングベクター(PCR2.1, Life technologies)を鋳型として、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara)を用いて、119Vおよび292Kの変異を含むプライマーでそれぞれPCRを実施した。それぞれのPCR産物を、クローニングベクターに存在するM13 Forward (-20)とM13 Reverseプライマーを用いてPCRを実施し、変異を含むNA遺伝子の全長DNAを取得した。これらのDNAに119Vと292Kの変異がそれぞれ挿入されていることを、ダイレクトシーケンス法による塩基配列の解析で確認した。これらを鋳型とし、AmpliScribe T7 High Yield Transcription Kits (CellScript)を用いて、119Vの耐性変異、292Kの耐性変異を含むNA遺伝子のRNAをそれぞれ作成し、耐性陽性コントロールとした。また、オセルタミビル感受性の陽性コントロールについても同様の方法で作成した。

2) リアルタイム PCR 法によるオセルタミビル耐性株迅速検出系の作成

耐性株と感受性株をリアルタイム PCR 法の融解曲線解析で検出する事が可能なプライマーを設計し、陽性コントロールを用いて検証した。陽性コントロール RNA を鋳型として uni12 プライマー(AGCAAAAGCAGG)と AMV XL Reverse transcriptase (Life Sciences)を加え、50°Cで 15 分反応させた後、95°Cで 5 分加熱し cDNA を合成した。この cDNA を用いて、SYBR Premix Ex Taq II (Takara)に E119V 検出用 (119E 特異的 primer: GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCC ATC TGG GTG ACA AGT GA , 119V 特異的 primer: CAT CTG GGT GAC AAG AGT, 共通 primer: GAA TGC ACG TTG TTT AGT GTT GTT CC)および R292K 検出用 (292R 特異的 primer: GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCG AGC CTT TCC AGT TGT ATC , 292K 特異的 primer: GAG CCT TTC CAG TTG TCT T , 共通 primer: TCA GGA AGT GCT CAG CAT GTC)のプライマーセットをそれぞれ加えリアルタイム PCR を行った。反応条件は、95°Cで 30 秒初期変性後に、95°Cで 5 秒と 60°Cで 30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、融解曲線解析により Tm 値 (融解温度) を測定した。さらに、NA 遺伝子解析済みの AH3 亜型ウイルス株を用いて、今回の方法とダイレクトシーケンシング法による解析結果について検証した。また、反応終了後の PCR 産物を電気泳動し、感受性陽性コントロールと耐性陽性コントロールのバンドの移動度を比較した。

3 結果

オセルタミビル耐性株検出には Tm シフトタイピング法^{3,4,5)}を利用した。その原理を図 1 に示す。AH3 亜型ウイルスの NA 遺伝子の 875 番目の塩基がグアニン (G) からアデニン (A) に変異すると、292 番目のアミノ酸がアルギニン (R) からリジン (K) に置換しオセルタミビル耐性となる。感受性株特異的なプライマーは 3' 末端の塩基が G に相補的な C であり、さらに GC-rich の配列を 5' 側に付加した (特異性を上げるため 3' 末端から 3 番目の塩基にミスマッチ変異を挿入)。これに対して耐性株特異的なプライマーは 3' 末端の塩基を A に相補的な T とした。これら 2 種類のプライマーと、NA 遺伝子の 上流側に結合するプライマーを同時に加えて PCR を実施すると、それぞれ特異的な方のプライマーのみを利用して PCR 反応が進行するため、最終的な PCR 産物は GC-rich な配列を含むものと含まないものに分かれる。GC-rich な配列を含む感受性株は融解曲線解析での Tm 値がより高温にシフトするため、Tm 値を比較する事で感受性株と耐性株が区別できる。なお、感受性株特異的プライマーを利用して増幅された PCR 産物は GC-rich の配列の 26bp だけ分子量が大きくなるため、PCR 産物を電気泳動することで耐性変異の有無を区別する事も可能である。E119V 変異についても同様のプライマーを設計した。図 2 に示したように、感受性および 119V 耐性陽性コントロールに対して、E119V 検出用のプライマーセットでリアルタイム PCR を実施し融解曲線解析を行うと、感受性陽性コントロールの Tm 値は 85.4°C、119V 耐性陽性コントロールの Tm 値は 81.3°Cで 4°C以上の差が見られた (図 2 A)。同様に R292K 変異検出用のプライマーセットでリアルタイム PCR を行った場合も、感受性陽性コントロールの Tm 値は 86.7°C、292K 耐性陽性コントロールの Tm 値は 82.5°Cで、4°C以上の差があった (図 2 B)。2010/11 シーズンから 2012/13 シーズンにかけて北海

道内で分離された AH3 亜型ウイルス 9 株から精製した RNA を用いて、cDNA 合成後に E119V および R292K 変異検出用のプライマーセットによるリアルタイム PCR を実施すると、感受性陽性コントロールの Tm 値に近い値が得られた (図 2 C、D)。これらの株はダイレクトシーケンス法による塩基配列解析で 119 番目および 292 番目のアミノ酸に耐性変異が存在していなかったため、リアルタイム PCR 法においてもこれと一致した結果が得られた。また、図 3 に示したように、これらの PCR 産物を電気泳動により比較すると、耐性陽性コントロールのバンドは感受性陽性コントロールより下に検出される。分離ウイルス株はどれも感受性陽性コントロールと同一の移動度を示したので、通常のサーマルサイクラーによる PCR 反応のみでも、耐性と感受性の区別は可能であると思われた。さらに、41 株の AH3 亜型ウイルス (全て耐性変異を含まず) から精製した RNA についても同様に、E119V および R292K 変異検出系で感受性陽性コントロールに近い Tm 値が得られたので、感受性と判定する事が可能であった。

4 考察

今回作成した薬剤耐性の迅速検出系は、蛍光標識されていない安価なプライマーセットを使用している。また、リアルタイム PCR 法だけではなく PCR 産物の電気泳動によっても耐性の有無の判定が可能のため、高価なリアルタイム PCR 装置のない施設においても低コストで実施する事ができる。耐性変異の有無の検査にはリアルタイム PCR 法だけではなく最終的にはシーケンスによる塩基配列の確認が必要であるが、大量のウイルス株を検査する際の一次スクリーニングの方法としてこのリアルタイム PCR 法は有用であると思われる。今後、この検出系を利用して多くの検体の検査を行い、オセルタミビル耐性株の監視を強化する予定である。

5 文献

- 1) Antivir Ther. 2009;14(6):751-61.
- 2) Lancet. 2004;364:759-65.
- 3) Genome Res. 1999;9(1):72-8.
- 4) Biotechniques. 2005;39(6):885-93.
- 5) Breed. Sci. 2008; 58(4):461-4.

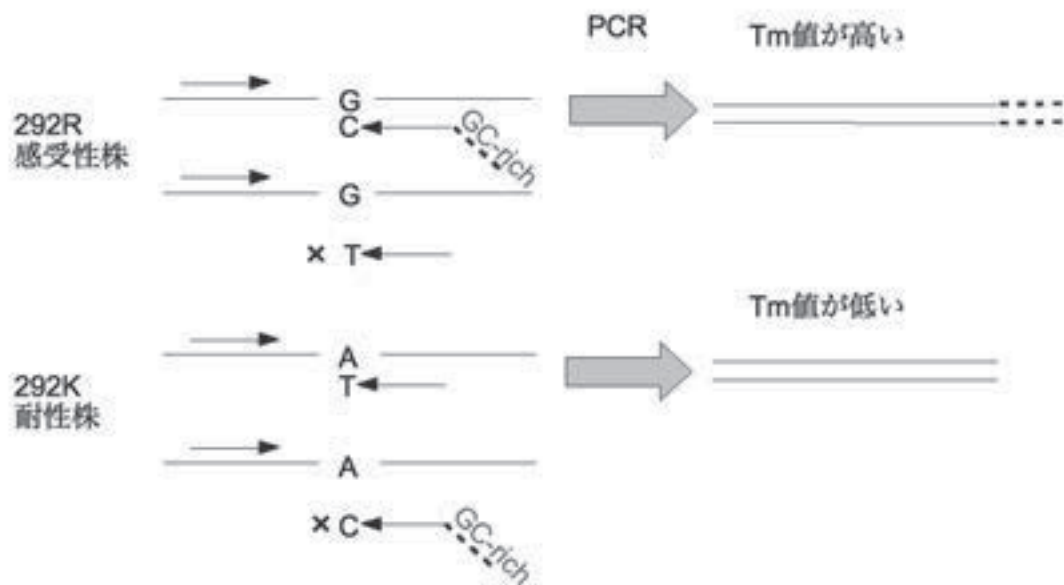


図1 Tmシフトタイピング法の原理

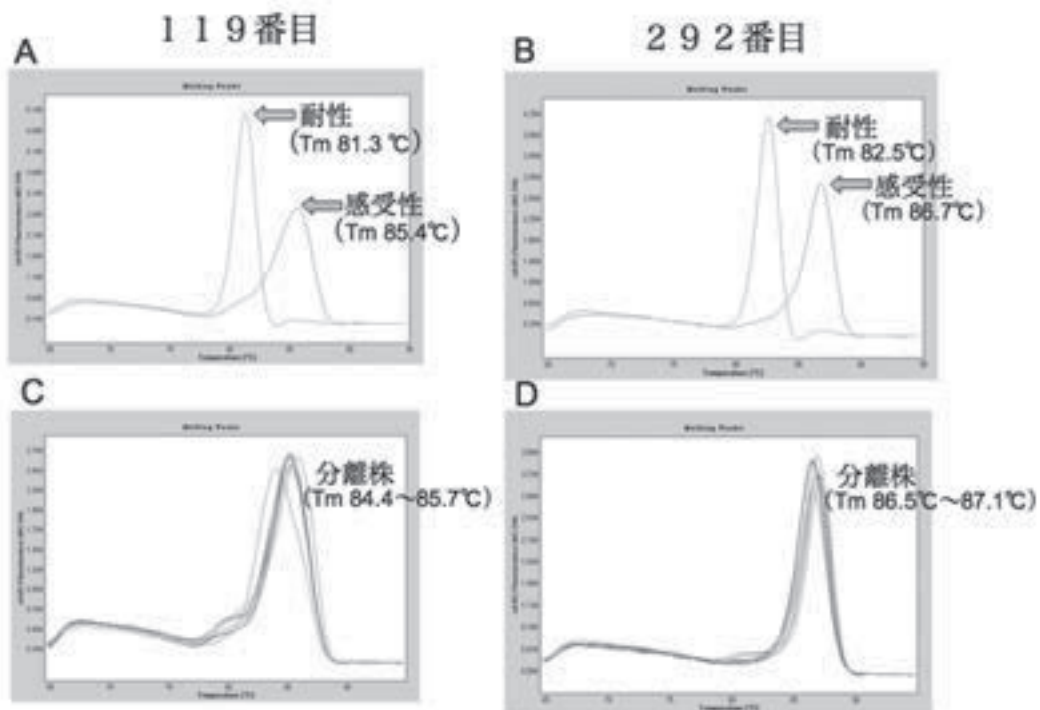


図2 融解曲線解析による判定

