

サイクリングプローブ法によるアマンタジン耐性 A 型インフルエンザ (Ser31Asn 変異) の迅速検出法の開発

鈴木康司¹⁾、齋藤玲子¹⁾、鈴木宏²⁾

1) 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 国際感染医学講座 公衆衛生学分野

2) 新潟青陵大学 看護福祉心理学部 看護学科

■研究の概要

インフルエンザは毎年の冬に流行を起こす感染症である。現在、インフルエンザの治療には抗インフルエンザ薬が使用されている。抗インフルエンザ薬は M2 阻害剤の アマンタジン (Am、商標名: シンメトレル) とノイラミニダーゼ阻害剤のオセルタミビル (商標名: タミフル) とザナミビル (商標名: リレンザ) がある。しかし、2005 年から季節性 A 型インフルエンザ H3N2 (香港型、季節性 A/H3N2) で Am 耐性株が流行し始め¹⁾²⁾、2006 年からは季節性 A 型インフルエンザ H1N1 (ソ連型、季節性 A/H1N1) においても Am 耐性株が流行を起こした³⁾⁴⁾。これらの Am 耐性株はインフルエンザウイルスの M2 遺伝子の 31 番目のアミノ酸残基がセリン (Ser、コドン AGT) からアスパラギン (Asn、コドン AAT) に変化した Ser31Asn 変異耐性ウイルスであった。

今回、我々は A 型インフルエンザ (季節性 A/H1N1、季節性 A/H3N2) の Am 耐性への関与をもたらす Ser31Asn 変異が一塩基置換で起きていることに注目し、この有無を迅速に検出する方法をサイクリングプローブ法を用いて開発することを目的とした。⁵⁾

■プライマー／プローブの設計

表. プライマー／プローブの設計

プライマー／プローブ	プライマー／プローブの配列 (5'-3')	設計位置 ^a
季節性 A/H1N1		
H1N1 MPF primer	5'-GCTCTAGCACTGGTCTGAAA-3'	696-715
H1N1 MPR primer	5'-AGGCGATCAATAATCCACAA-3'	831-850
H1N1 AS probe ^b	5'-(FAM)-TGCCGCAA G TA-(Eclipse ^d)-3'	797-807
H1N1 AR probe ^b	5'-(ROX)-TGCCGCAA A TA-(Eclipse ^d)-3'	797-807
季節性 A/H3N2		
H3N2 MPF primer	5'-AGACCTATCAGAAACGAATG-3'	738-757
H3N2 MPR primer	5'-CACAGTATCAAGTGCAAG-3'	818-835
H3N2 AS probe ^b	5'-(FAM)-TGCTGCGA G TA-(Eclipse ^d)-3'	796-807
H3N2 AR probe ^b	5'-(ROX)-TTGCTGCGA A TA-(Eclipse ^d)-3'	796-807

a A 型インフルエンザの M 遺伝子 (1027bp) を対象に設計したプライマー／プローブの設計位置

b 蛍光色素を標識した DNA/RNA のキメラプローブ (RNA を斜体の太字で記載)

c 蛍光色素

d クエンチャー

A 型インフルエンザの M 遺伝子中にコードされている M2 タンパク部位をターゲットにし、季節性 A/H1N1 と季節性 A/H3N2、それぞれについてプライマーを設計した。プローブは M2 タンパクの 31 番目のアミノ酸をコードしている領域に設定した。感受性ウイルスを検出する FAM プローブ (H1N1 AS probe、H3N2 AS probe) は Ser をコードしている A(G)T の (G) を RNA に置換した。耐性ウイルスを検出する ROX プローブ (H1N1 AR probe、H3N2 AR probe) は Asn をコードしている A(A)T の (A) を RNA に置換した。季節性 A/H1N1 と季節性 A/H3N2 のそれぞれを特異的に検出するプライマー／プローブを作製した。

PCR 条件

反応組成)

試薬: CycleavePCR® Core Kit (製品コード CY501)

推奨条件で反応

鋳型: インフルエンザウイルスの RNA を逆転写した cDNA
(培養検体と臨床検体)

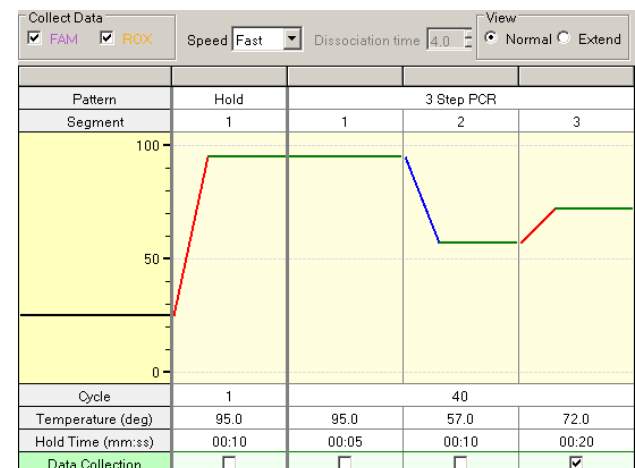
反応条件)

装置: Thermal Cycler Dice® Real Time System

条件: 95.0°C-10sec

95.0°C-5sec
57.0°C-10sec
72.0°C-15sec

40Cycle



■結果

1. 季節性 A/H1N1 の反応性

季節性 A/H1N1 について、Am 感受性の臨床検体 (20 件) と培養検体 (4 件)、Am 耐性の臨床検体 (20 件) と培養検体 (4 件) を用い、RNA 抽出後 Uni12 (A 型インフルエンザ共通プライマー) を用いて cDNA を作成し、サイクリングプローブ反応を行った。Am 感受性季節性 A/H1N1 では臨床検体と培養検体のどちらも感受性を検出する FAM プローブ (H1N1 AS probe) と反応し、FAM の蛍光のみ検出された (図 1)。Am 耐性季節性 A/H1N1 についても臨床検体と培養検体のどちらも ROX プローブ (H1N1 AR probe) と反応し、ROX の蛍光を検出した (図 2)。

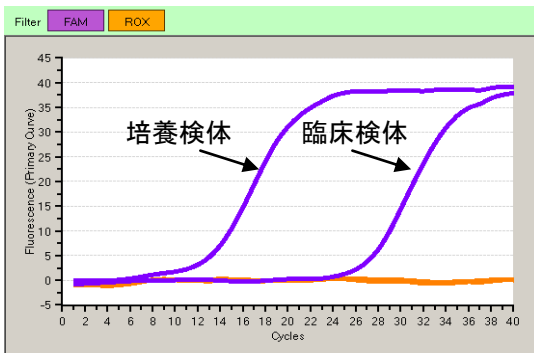


図 1. Am 感受性季節性 A/H1N1 の検出

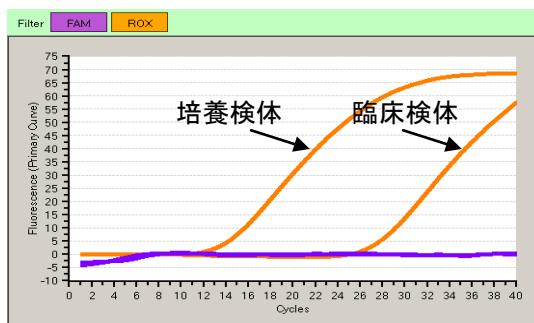


図 2. Am 耐性季節性 A/H1N1 の検出

2. 季節性 A/H3N2 の反応性

季節性 A/H3N2 も季節性 A/H1N1 と同様に Am 感受性の臨床検体 (20 件) と培養検体 (4 件)、Am 耐性の臨床検体 (20 件) と培養検体 (4 件) を用いて反応を行った。Am 感受性の臨床検体と培養検体はどちらも感受性を検出する FAM プローブ (H3N2 AS probe) と反応し、FAM の蛍光のみ検出された (図 3)。Am 耐性についても臨床検体と培養検体のどちらも ROX プローブ (H3N2 AR probe) と反応し、ROX の蛍光を検出した (図 4)。

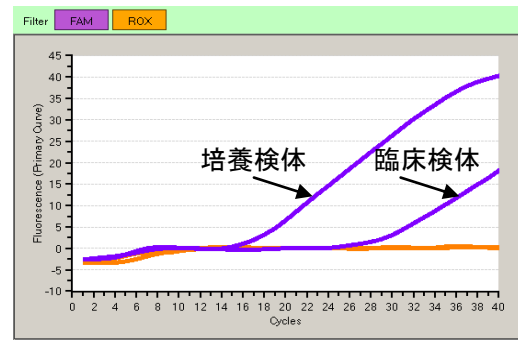


図 3. Am 感受性季節性 A/H3N2 の検出

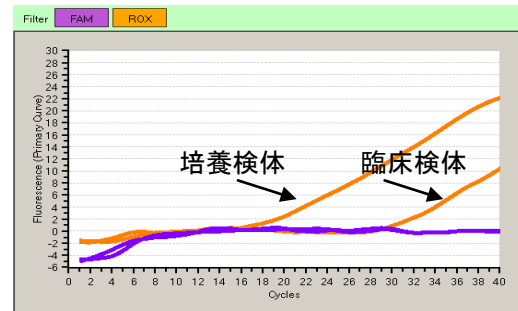


図 4. Am 耐性季節性 A/H3N2 の検出

3. プローブの特異性

今回作製した季節性 A/H1N1 と季節性 A/H3N2 のプライマー/プローブの特異性を、異なるインフルエンザの型や亜型 (A 型 (季節性 A/H1N1、季節性 A/H3N2)、B 型)、他の呼吸器疾患原因ウイルス (RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス) の検体を用いて確認した。季節性 A/H1N1 のプライマー/プローブは季節性 A/H1N1 の検体とのみ反応し、他の型や亜型、他のウイルスとは反応しなかった。季節性 A/H3N2 のプライマー/プローブも季節性 A/H1N1 と同様に季節性 A/H3N2 のみと反応した。

■考察

今回、我々は Am 耐性 A 型インフルエンザ (Ser31Asn 変異) をサイクリングプローブ法を用いて迅速に検出する方法を開発した。本法は培養検体と臨床検体のどちらを用いても Ser31Asn 変異の有無を検出することが可能であり、さらに、他のウイルスとの非特異的な反応が起きないことが示された。そのため、今回我々が開発した本法は A 型インフルエンザの Ser31Asn 変異のスクリーニングに非常に有効であることが示唆された。今後、他の薬剤耐性変異部

位をターゲットに様々なプローブを設計・作製することで、薬剤耐性変異のスクリーニングに応用可能であると考えられる。

[参考文献]

- 1) Bright, R., M. Medina, X. Xu, G. Perez-Oronoz, T. Wallis, X. Davis, L. Povinelli, N. Cox, and A. Klimov. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. (2005) *Lancet* 366:1175-1181.
- 2) Saito, R., D. Li, and H. Suzuki. Amantadine-resistant influenza A (H3N2) virus in Japan, 2005-2006. (2007) *NEJM*. 356:312-313.
- 3) Deyde, V., X. Xu, R. Bright, M. Shaw, C. Smith, Y. Zhang, Y. Shu, L. Gubareva, N. Cox, and A. Klimov. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. (2007) *J. Infect. Dis.* 196:249-257.
- 4) Saito, R., Y. Suzuki, D. Li, H. Zaraket, I. Sato, H. Masaki, T. Kawashima, S. Hibi, Y. Sano, Y. Shobugawa, T. Oguma, and H. Suzuki. Increased incidence of adamantane-resistant influenza A(H1N1) and A(H3N2) viruses during the 2006-2007 influenza season in Japan. (2008) *J. Infect. Dis.* 197:630-632.
- 5) Suzuki Y., Saito R., Zaraket H., Daput C., Caperig-Daput I., and Suzuki H. Rapid and Specific Detection of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses with a Ser31Asn Mutation by the Cycling Probe Method(2010) *J. Clin. Microbiol.*, 48:57-63.