

サイクリング・プローブ法による 薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出法の 開発と応用

鈴木康司¹、齋藤玲子¹、クライド ダパット¹、
イゾルデ ダパット¹、鈴木貴子¹、近藤大樹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

インフルエンザウイルスとは

■インフルエンザウイルス

A型, B型, C型

■A型インフルエンザウイルス

ヘマグルチニン(HA)・・・1～16種

ノイラミニダーゼ(NA)・・・1～9種

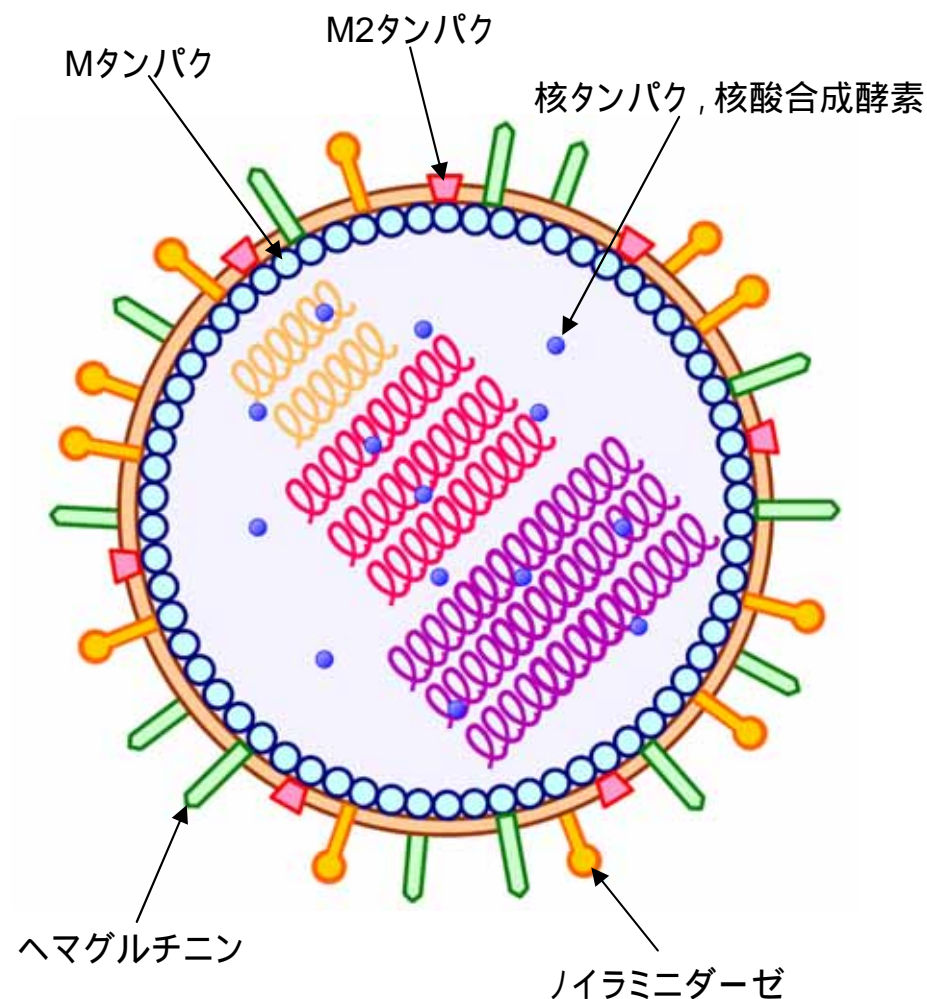
■ヒトの間での流行

新型A/H1N1

A/H1N1(ソ連型)

A/H3N2(香港型)

B型インフルエンザ



インフルエンザウイルスの治療薬

■アマンタジン(商品名:シンメトレル、Am)

M2阻害剤。インフルエンザのM2タンパクのイオンチャンネルの機能を阻害し、インフルエンザの複製を防ぐ。A型インフルエンザのみに有効。



■オセルタミビル(商品名:タミフル、Tm)

ノイラミニダーゼ(NA)阻害剤。インフルエンザのNAの働きを阻害し、インフルエンザの複製を防ぐ。A型、B型どちらのインフルエンザにも有効。内服タイプ。

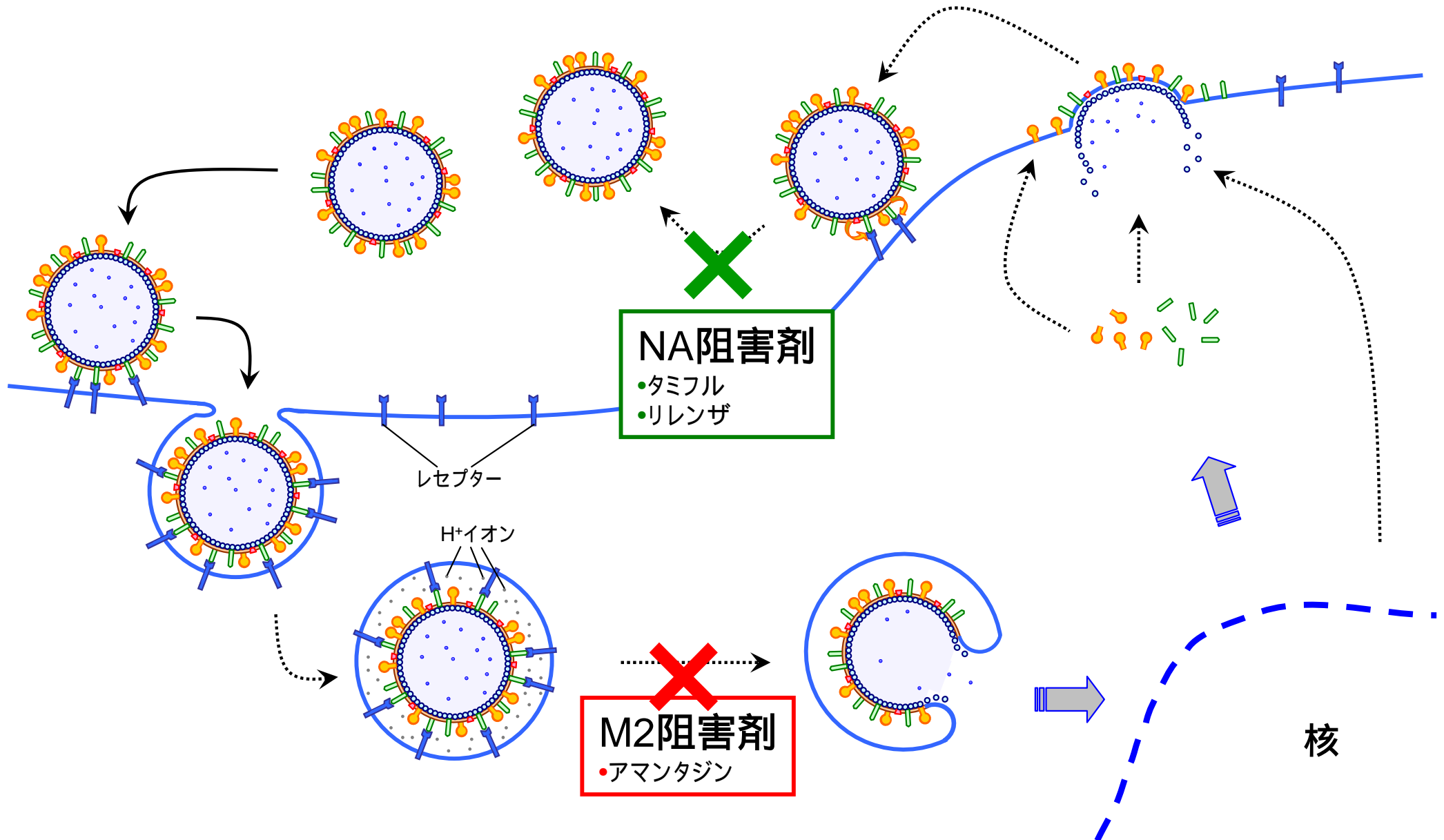


■ザナミビル(商品名:リレンザ)

NA阻害剤。Tmと同様にA型、B型どちらのインフルエンザにも有効。吸入タイプ。



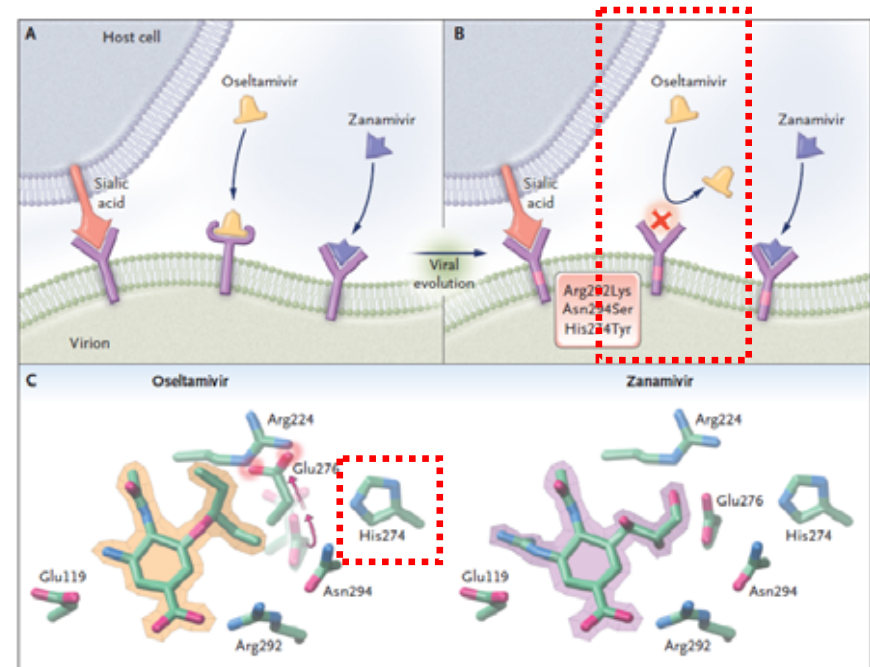
ウイルスの増殖と抗ウイルス薬の作用



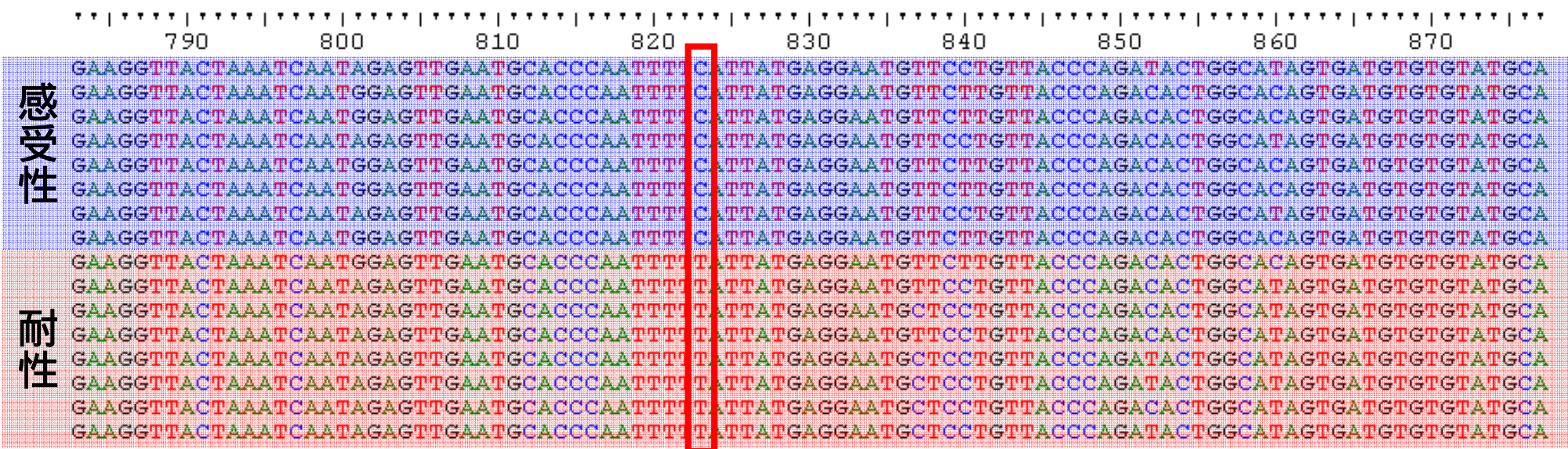
薬剤への耐性変異

■ Tmへの耐性変異

NA活性部位のアミノ酸変異で耐性化
(H275Y)



Moscona A. N Engl J Med 2009;360:953-956



薬剤耐性ウイルスの発生動向

Am耐性変異 (S31N) ウイルス

- ◆2005-06年、A/H3N2でAm耐性ウイルスが急増し、世界的に流行
- ◆2006-07年、A/H1N1でAm耐性ウイルスが増加
- ◆2009-10年、新型では全てがAm耐性ウイルス

Tm耐性変異 (H275Y) ウイルス

- ◆2007-08年、A/H1N1のTm耐性ウイルスが北欧を中心に流行
- ◆2008-09年、本邦ではA/H1N1がTm耐性ウイルス
(Am感受性ウイルス)
- ◆2009-10年、新型はTm感受性ウイルス
(散発的にTm耐性ウイルスが発生)

2005-06年以降、薬剤耐性ウイルスは世界的に流行し、
薬剤耐性サーベイランスの重要性が高まっている

目的

薬剤耐性変異を持つインフルエンザウイルスの迅速なスクリーニング方法の開発

-サイクリングプローブ法による一塩基置換検出-

- 半日程度で検出可能
- 適正な薬剤を選択するのに有効
- 治療の経過中にも耐性の有無を調べることも可能

対象

季節性 A/H1N1 (ソ連型)

- Am耐性変異 (M2-S31N)
- Tm耐性変異 (NA-H275Y)

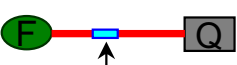


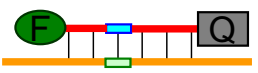
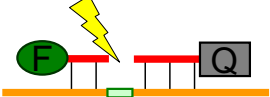

新型インフルエンザ (A/H1N1)

- Am耐性変異 (M2-S31N)
- Tm耐性変異 (NA-H275Y)

季節性 A/H3N2 (香港型)

- Am耐性変異 (M2-S31N)

サイクリングプローブ法とは

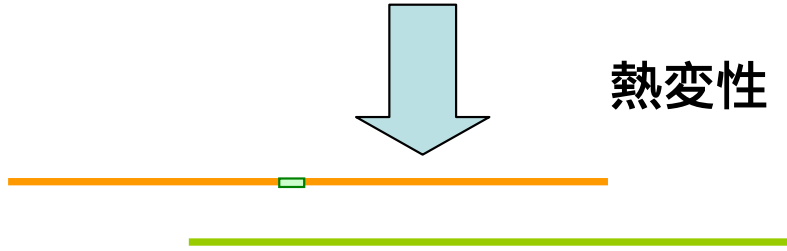
- ✓ RNAとDNAからなるキメラプローブ () と RNase H () の組み合わせによる高感度な検出法

- ✓ 増幅産物中の相補的な配列とプローブがハイブリッドを形成した後 () に RNase H により RNA 部分で切断される () ことにより、強い蛍光 () を発する
- ✓ この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることができる
- ✓ プローブのRNA部分がミスマッチであれば RNase H により切断されることはないので、一塩基の違いも認識できる非常に特異性の高い検出方法

サイクリングプローブ法

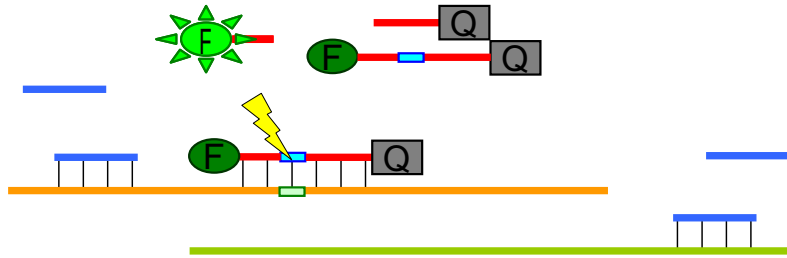
遺伝子(DNA)



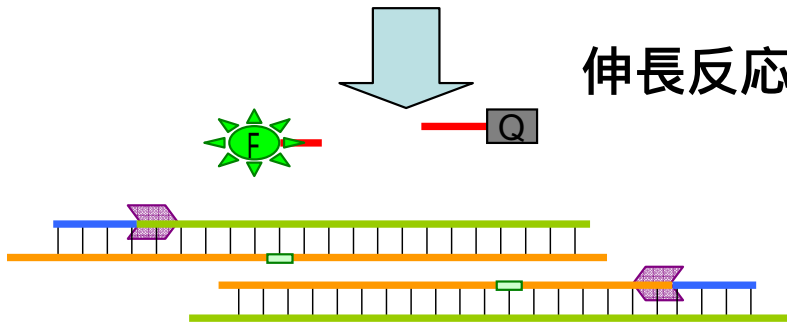
熱変性



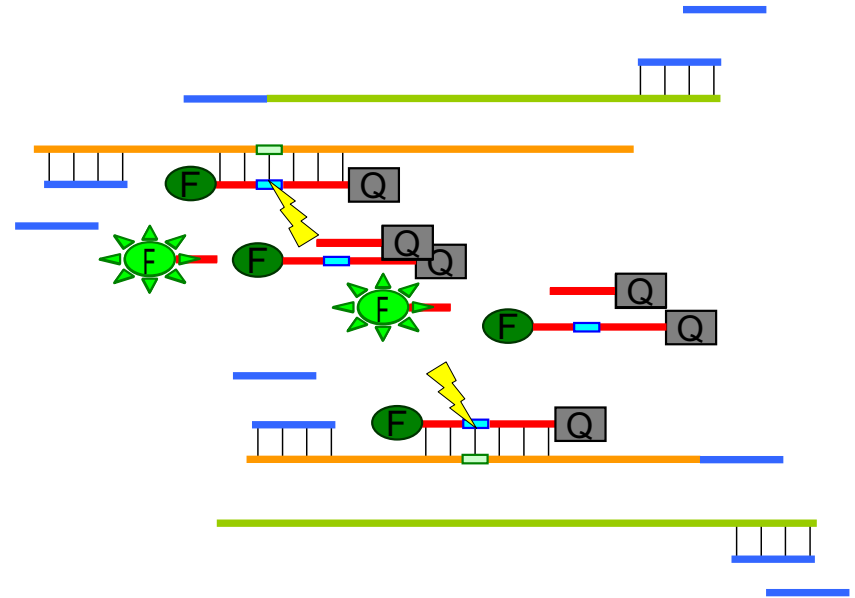
プローブのアニーリングと切断



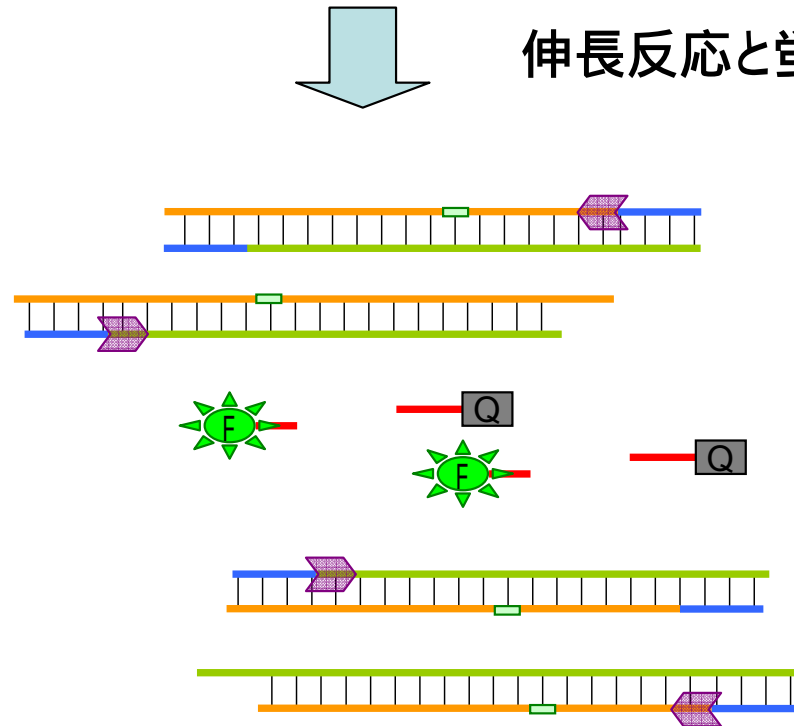
伸長反応と蛍光検出



熱変性
プローブのアニーリングと切断



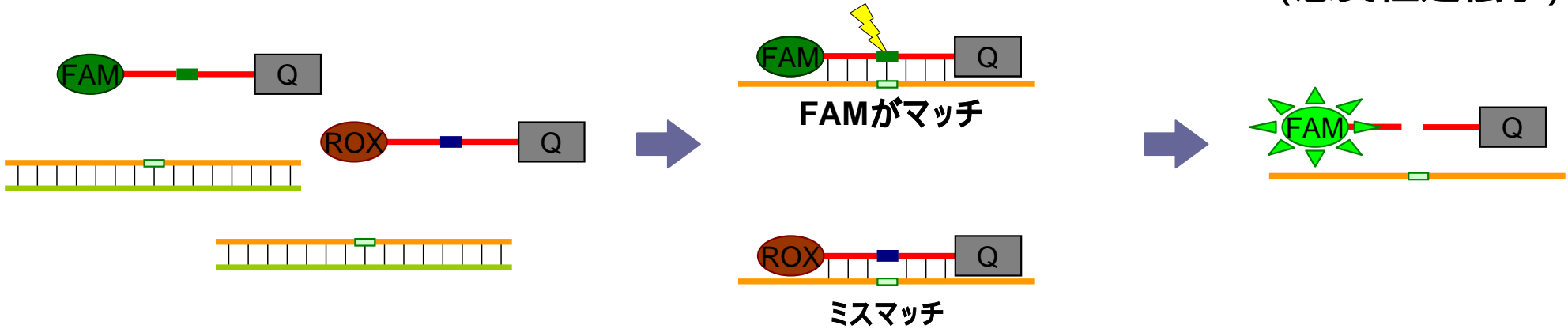
伸長反応と蛍光検出



サイクリングプローブ法 —塩基置換の検出

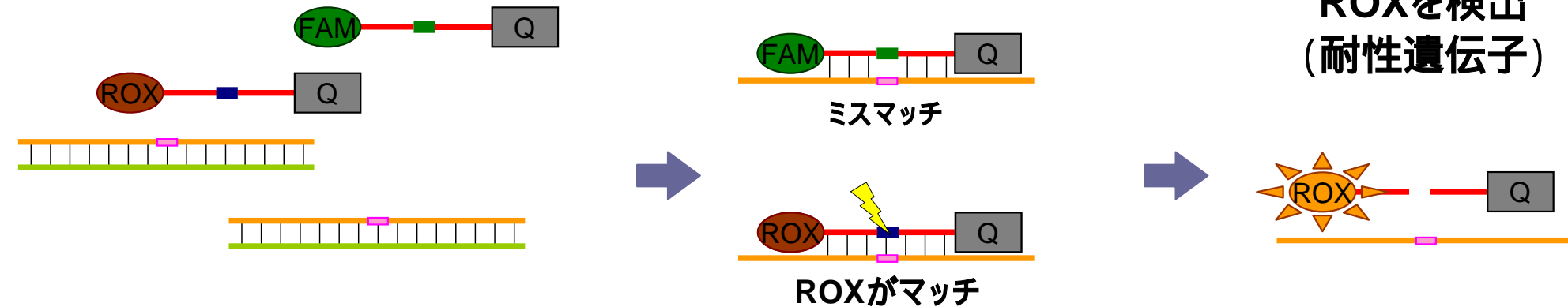
* 2種類の蛍光色素 (FAMとROX) で感受性と耐性を検出 *

感受性の遺伝子



RNase Hによる分解

耐性の遺伝子



Am耐性M2-S31N変異検出のプライマーとプローブ

亜型	プライマーとプローブ	プライマーとプローブの配列 (5'-3')	位置 ^a
季節性 A/H1N1 (ソ連型)	H1N1_MPF_primer	5'-GCTCTAGCACTGGTCTGAAA-3'	696-715
	H1N1_MPR_primer	5'-AGGCGATCAATAATCCACAA-3'	831-850
	H1N1_S31_probe ^b	5'-(FAM ^c)-TGCCGCAAG [■] TA-(Eclipse ^d)-3'	797-807
	H1N1_N31_probe ^b	5'-(ROX ^c)-TGCCGCAA [■] TA-(Eclipse ^d)-3'	797-807
季節性 A/H3N2 (香港型)	H3N2_MPF_primer	5'-AGACCTATCAGAAACGAATG-3'	738-757
	H3N2_MPR_primer	5'-CACAGTATCAAGTGCAAG -3'	818-835
	H3N2_S31_probe ^b	5'-(FAM ^c)-TGCTGCGAG [■] TA-(Eclipse ^d)-3'	796-807
	H3N2_N31_probe ^b	5'-(ROX ^c)-TTGCTGCGAA [■] TA-(Eclipse ^d)-3'	796-807
新型 A/H1N1	H1N1pdm_MPF_primer	5'-TCCAGTGCTGGTCTGAAAG-3'	698-716
	H1N1pdm_MPR_primer	5'-TCCACAATATCAGGTGCAAG-3'	818-836
	H1N1pdm_S31_probe ^b	5'-(FAM ^c)-TGCAGCAA [■] TA-(Eclipse ^d)-3'	797-807
	H1N1pdm_N31_probe ^b	5'-(ROX ^c)-GCAGCAA [■] TA-(Eclipse ^d)-3'	798-807

^a プライマーとプローブの位置は A型インフルエンザの M遺伝子 (1027bp) に設定

^b 蛍光物質を標識したキメラプローブ (RNAは太字の斜体で表記)

^c 蛍光色素

^d クエンチャー

■ : 耐性変異部位
□ : RNA置換部位

実験フローチャート

咽頭ぬぐい液, 培養検体

RNA抽出 約45分

cDNA合成 約60分

サイクリングプローブ法 約85分

RNA抽出

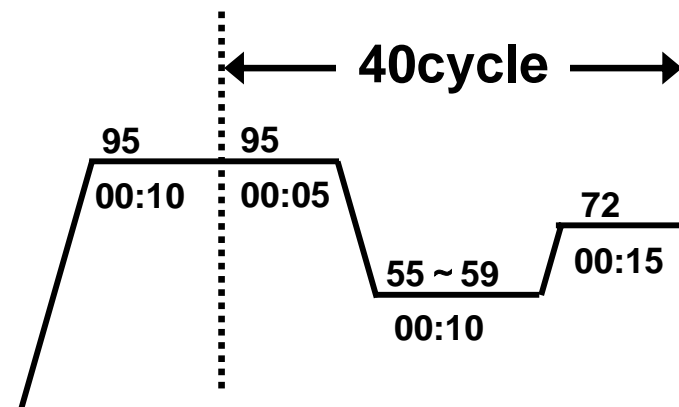
EXTRAGEN (カイノス)のプロトコールに準じて行った

cDNA合成

M-MLV Reverse Transcriptase (invitrogen) を用いて行った

サイクリングプローブ法

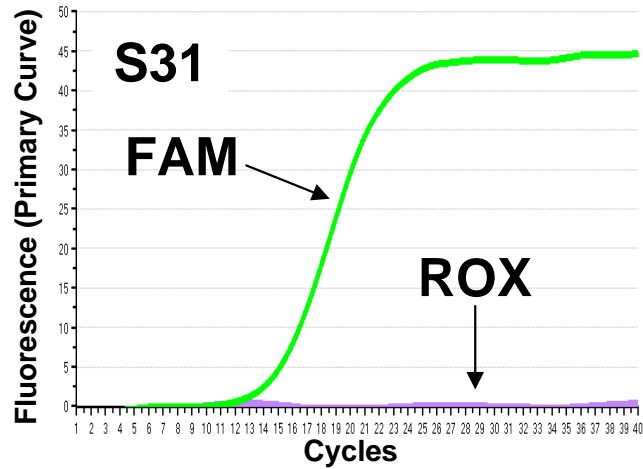
CycleavePCR® Core Kit (タカラバイオ)のプロトコールに準じて行った



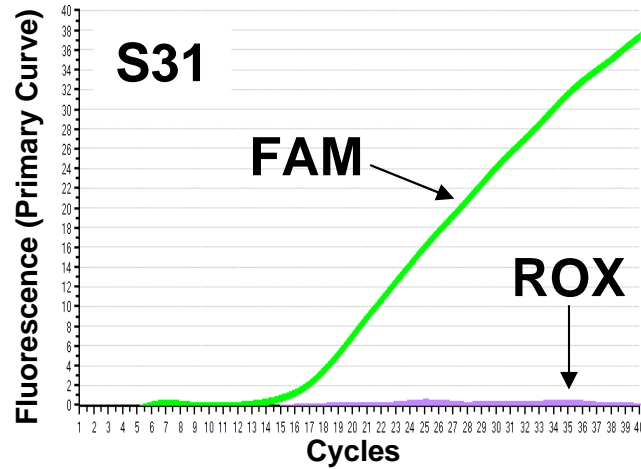
合計約3時間で薬剤耐性変異ウイルスの検出が可能

Am耐性変異検出プローブとコントロールプラスミドの反応 (FAM(変異なし;S31)とROX(変異あり;S31N))

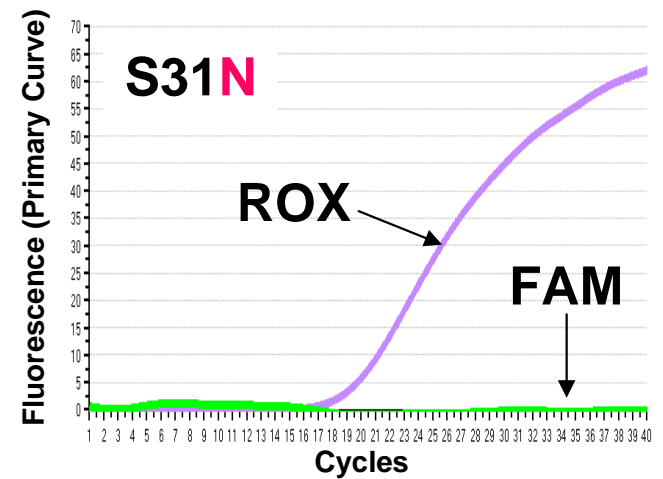
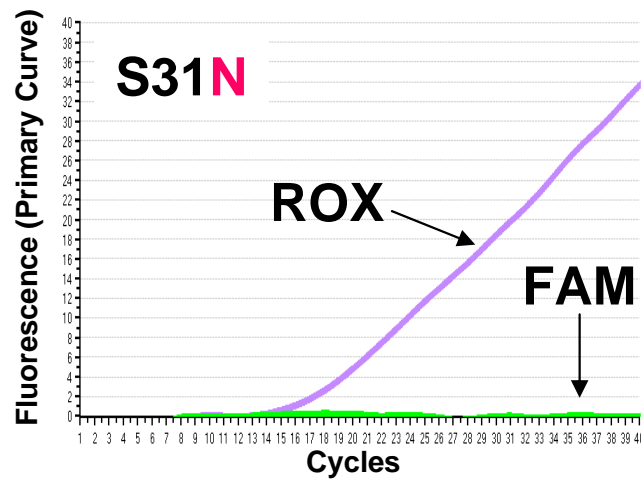
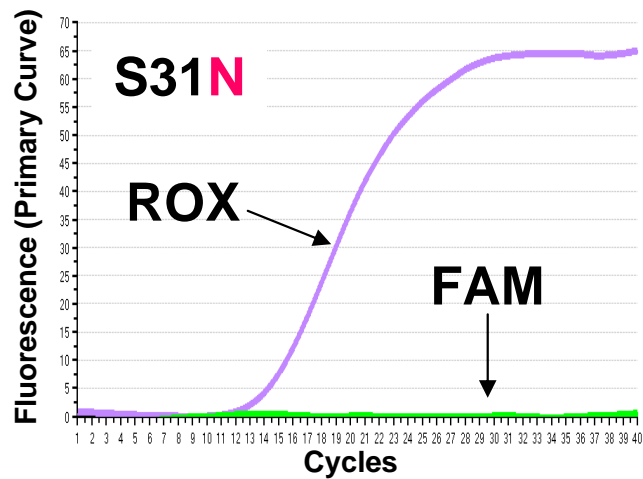
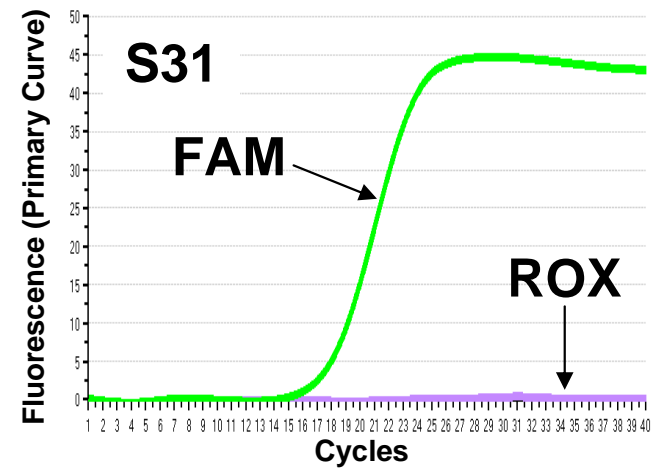
◆ H1N1 (ソ連型)



◆ H3N2 (香港型)

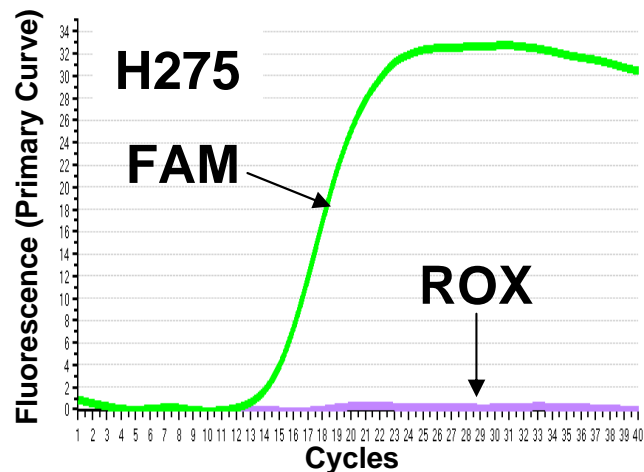


◆ 新型H1N1

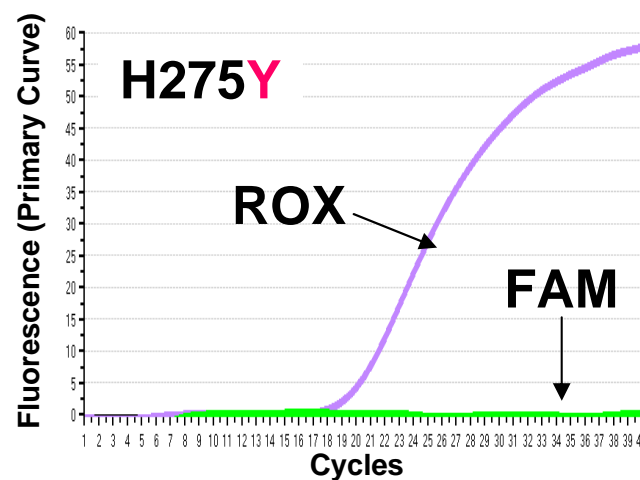
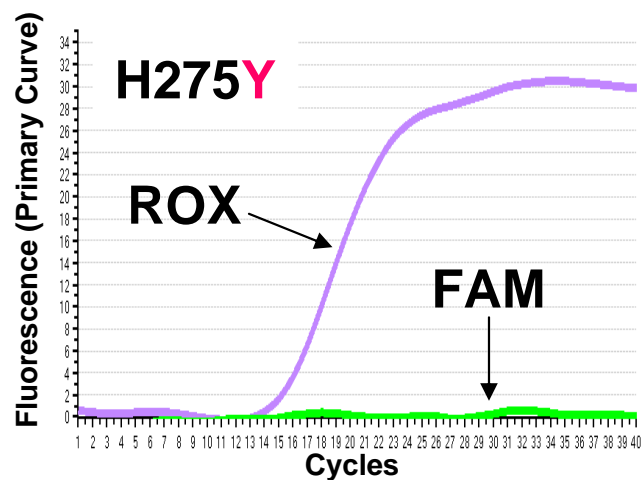
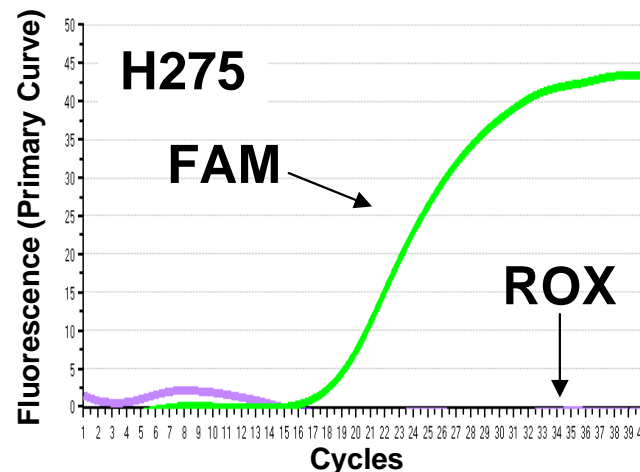


Tm耐性変異検出プローブとコントロールプラスミドの反応 (FAM(変異なし;H275)とROX(変異あり;H275Y))

◆ H1N1 (ソ連型)

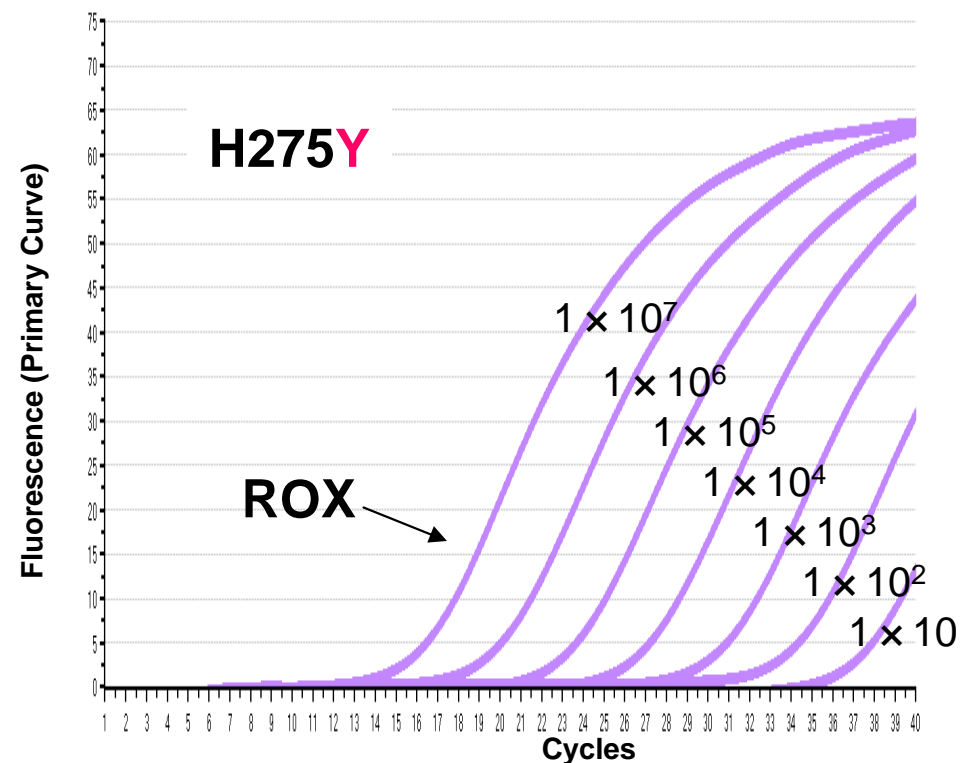
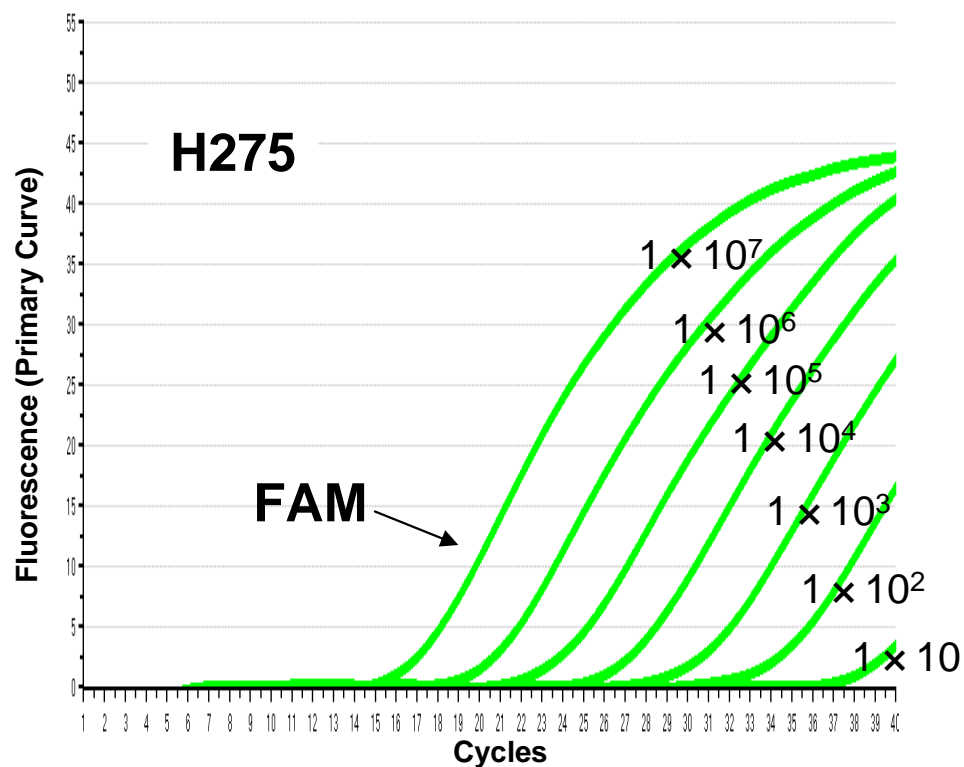


◆ 新型H1N1



コントロールプラスミドによる検出限界

◆ 新型H1N1 (H275Y検出系) のプローブとコントロールプラスミドの検出限界



- 新型A/H1N1用のプローブでは、10コピーのプラスミドまで検出可能であった。
- 他のプローブでも同様の結果が得られた。

プローブの特異性

◆ H275Y検出系のプローブと型、亜型間の特異性

インフルエンザウイルス	NA遺伝子の変異	検体数	プローブ			
			sH1N1-His275	sH1N1-Tyr275	H1N1pdm-His275	H1N1pdm-Tyr275
季節性 A/H1N1 (ソ連型)	-	10	10	0	0	0
	H275Y	10	0	10	0	0
新型 A/H1N1	-	10	0	0	10	0
	H275Y	3	0	0	0	3
季節性 A/H3N2 (香港型)	-	10	0	0	0	0
B型インフルエンザ	-	10	0	0	0	0

- 季節性A/H1N1用のプローブでは、季節性A/H1N1のみに反応し、その他の型、亜型には反応しなかった。
- 新型A/H1N1も同様な結果が得られ、Am耐性変異検出用のプローブでも同様の結果が見られた。

Am耐性変異S31N検出系の反応性

流行時期	2007-2008		2008-2009		2009-2010
亜型 (検体の種類)	A/H1N1 (培養検体)	A/H3N2 (培養検体)	A/H1N1 (培養検体)	A/H3N2 (培養検体)	A/H1N1pdm (培養検体と臨床検体)
検体数	669	68	743	334	601
FAMプローブの検出数	245	0	740	0	2
ROXプローブの検出数	411	62	0	333	598
未反応検体数	13	6	3	1	1
プローブの反応率 (%)	98.1 (656/669)	91.2 (62/68)	99.6 (740/743)	99.7 (333/334)	99.8 (600/601)
耐性ウイルスの頻度 (%)	62.7 (411/656)	100 (62/62)	0 (0/740)	100 (333/333)	99.7 (598/600)
耐性ウイルスの頻度 (%) (シーケンスによる結果)	62.9 (421/669)	100 (68/68)	0 (0/743)	100 (334/334)	99.7 (599/601)

●全てのシーズンを通しての亜型で検討すると98%以上の株で検出可能

A/H1N1 : (1396/1414, 98.9%)

A/H3N2 : (395/402, 98.3%)

A/H1N1pdm : (600/601, 99.8%)

Tm耐性変異H275Y検出系の反応性

流行時期	2007-2008	2008-2009	2009-2010
亜型 (検体の種類)	A/H1N1 (培養検体)	A/H1N1 (培養検体)	A/H1N1pdm (培養検体と臨床検体)
検体数	385	743	601
FAMプローブの検出数	382	0	592
ROXプローブの検出数	0	742	0
未反応検体数	3	1	9
プローブの反応率 (%)	99.2 (382/385)	99.9 (742/743)	98.5 (592/601)
耐性ウイルスの頻度 (%)	0 (0/382)	100 (742/742)	0 (0/592)
耐性ウイルスの頻度 (%) (シーケンスによる結果)	0.4 (3/669)	100 (743/743)	0 (0/601)

- 全てのシーズンを通しての亜型で検討しても98%以上の株で検出可能

A/H1N1 : (1124/1128, 99.6%)

A/H1N1pdm : (592/601, 98.5%)

まとめ

- ✓ サイクリングプローブ法を用いた薬剤耐性変異ウイルスの迅速で特異的な検出法を開発
- ✓ 薬剤耐性株の発生頻度

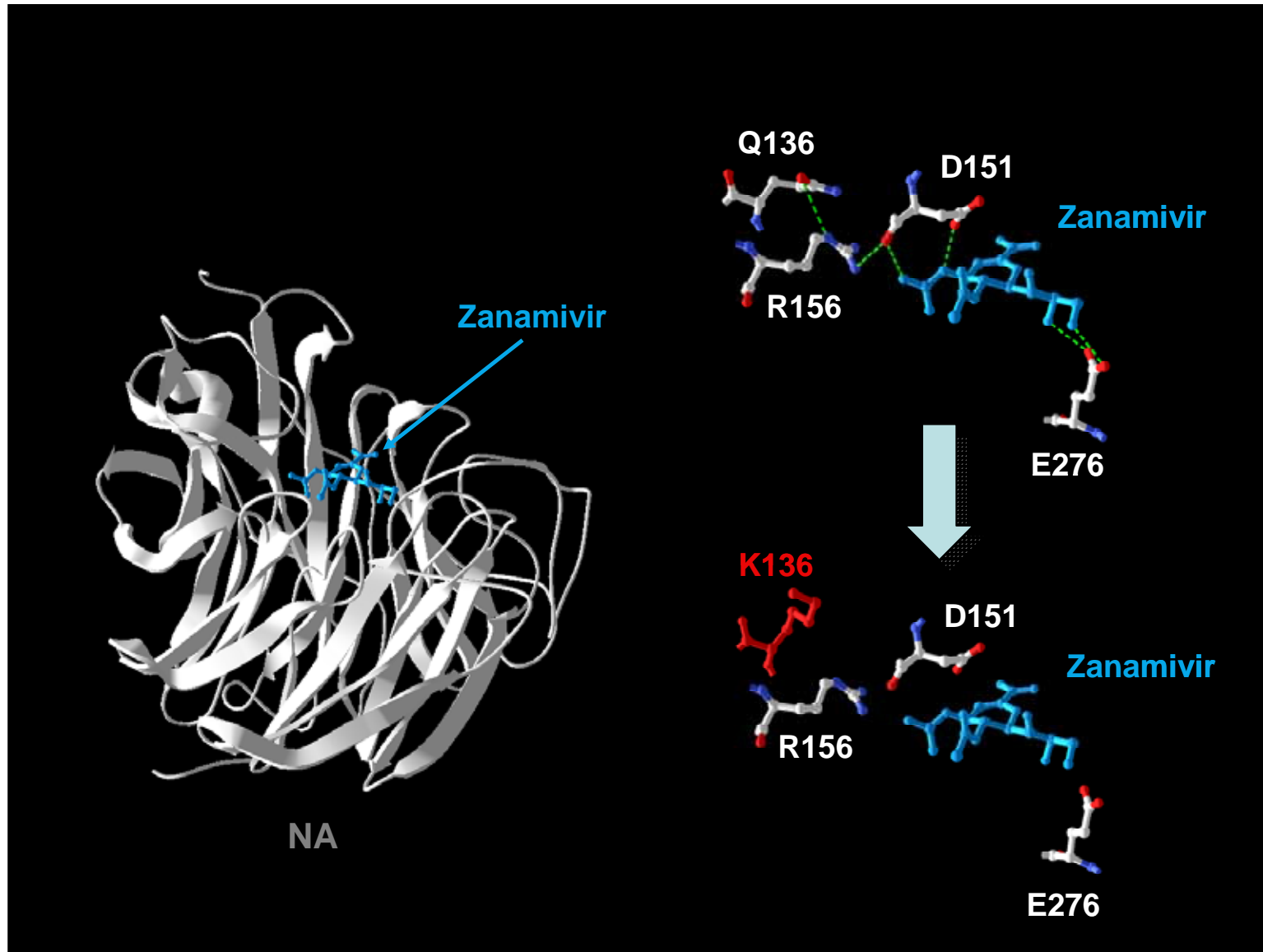
流行時期	亜型	Am耐性頻度 [%]	Tm耐性頻度 [%]
2007-2008	季節性H1N1	62.9	0.4
	季節性H3N2	100	-
2008-2009	季節性H1N1	0	100
	季節性H3N2	100	-
2009-2010	新型H1N1	99.7	0

耐性ウイルスは発生しているが、同時に2つの薬剤耐性になることは稀である。

既知の耐性変異ウイルスの検出には非常に有効

しかし、未知の耐性ウイルス発生の可能性もあり、遺伝子型だけでなく表現型や臨床型についても注意が必要である

ちょっと紹介 -ミャンマーで分離された季節性H3N2のリレンザ耐性変異(Q136K)-



136位のグルタミンは、156位のアルギニン及び、酵素活性中心の151位のアスパラギン酸と、水素結合ネットワーク(緑の破線)を形成している。136位がリジンに変わることによって水素結合が破れ、NA蛋白とザナミビル複合体が安定的に形成されなくなる。その結果、耐性化