

ウイルス食中毒を疑う事例に関係する便、食品検体が30件検査依頼され、1台では対応困難であった。そのため、遺伝子組換え食品検査用のリアルタイムPCR(7000型)をノロウイルス検査用として活用した。また、同時並行検査やバックアップ用に保健所市場検査系のリアルタイムPCR(7300型)を借用し、その後補正予算でリアルタイムPCR(7900型)を購入することができた。しかし、購入予算は臨時議会での補正予算で対応したことから、予算成立までに時間を要し、9月30日に納入となり緊急での機器導入方法について課題があった。

5月16日神戸市で国内第1例が発生したことから札幌市でも対策会議を開催することになり、この事例が定点ウイルスサーベイランスの検体であったことから、札幌市内の感染拡大確認のため4月、5月分の定点ウイルスサーベイランス77検体を職員1名が5月17日の休日1日で緊急PCR検査を実施した。この緊急検査時には、初期で人的体制が万全でなく、担当者の過大な負担を強いることとなった。

6月11日に市内第1例目の海外渡航歴のある陽性者発見となったが、他の自治体で発見されている中で陽性例が出ないことから職員の不安があった。また、記者発表に市衛研職員が同席することで、市衛研の存在を市民にアピールできるよい機会であった。

札幌市第1例目確定患者は感染症病棟に隔離され、4回PCR検査を実施したが陰性とならず退院が延長され、退院の基準について検討が必要であった。

5月、6月は検体搬入時、市衛研でも迅速診断キットでの確認を行った。医療機関でA型陽性23検体中16検体で市衛研の迅速診断キットで陰性であり、一部の医療機関から判定後のキットの提供を得たが、ラインの確認できない明らかな陰性を弱い陽性と判断している例が確認

できた。また、AB型いずれも陽性でPCR陰性例もあり、非特異反応と思われる例も確認できた。

一方、7月に検査を実施しPCRで新型インフルエンザ陽性となった60検体中47検体が迅速診断キットでA陽性であり、陽性率79%と迅速診断キットで陰性となる例も多く認められた。

### 3 関係機関との連携

市衛研では高病原性鳥インフルエンザを想定した検査体制を整備していたことから、新型株がブタ由来であっても速やかに検査法が示され、1日の検討で使用のめどがたち、5月3日から検査可能となった。感染研からの情報や地衛研間の連携もスムーズに行えた。しかし、当初は国の方針で確認検査を地衛研と感染研の両方で実施となっていたことや、水際作戦で国内感染を防ぐことが可能という幻想を抱かせるなど厚労省の度重なる方針変更があり、地域の実情と必ずしも一致しないこともあったが、保健所を中心とした積極的な対策によって初期、蔓延期に対応できたものと思われる。

緊急検査の必要性の判断は保健所医師職が対応し、直接医療機関から市衛研への検査申し込みとしなかったことから、検査体制の維持と検査依頼及び報告が混乱なく行えたことは評価すべきと思われる。

### 4 ウイルスサーベイランス事業

定点ウイルスサーベイランスは小児科、内科、眼科の15か所から集められているが、国からの通知の変更により検体数に制限を設けなかったことから、一時的に1医療機関から多量に依頼されることになり混乱したため、従来どおり1医療機関当り1週間5件程度として実施することとした。しかし、昨年実績と比較して1.7倍の検査数となり、インフルエンザ以外の確認が一部滞る結果になった。

定点ウイルスサーベイランスでの型別検出状況の

調査では蔓延期になってから 37、38 週で確認されたA香港型 2 例以外すべて新型となり、迅速B型陽性と報告されていた検体の確認検査においてもB型ではないと判明するなど、医療機関では迅速診断のみの情報のなかで、型別検出状況調査は重要な意味を持った。1 月以降どのような型が流行するかは現時点で判断できないが、引き続き早期の情報提供を図っていきたい。

## 5 タミフル耐性解析

高病原性への変異や薬物耐性などの確認は今後の拡大や治療方針などに重要なことから、Aソ連型で 2008/09 シーズンに確認されているH275Y解析を行った。主に分離培養された株 416 件について解析したところ 2 件の耐性が確認された。いずれも定点ウイルスサーベイランスからの検体で、発生頻度は 0.48%となった。

1 例目はタミフルを処方されていない例で、2 例目はタミフルを処方された家族内感染例であり、いずれもその後感染拡大は確認されていない。今後とも変異情報の収集に努め、検査情報提供に努めていきたい。

## 6 血清抗体価測定

新型インフルエンザウイルスに対する血清中HI抗体価について、患者およびワクチン接種前後における血清抗体価の推移について調査した。この結果、患者において、発症後9日以上経過して採血された試料について、いずれも40倍以上の抗体価となることが確認された。季節性インフルエンザについて、抗インフルエンザ薬の投与時期によっては、抗体価が上昇しない場合があるが、今回検査し患者のほとんどが、発症後すみやかに抗インフルエンザ薬の投与を受けていたにもかかわらず、抗体価が上昇していることが確認できた。

抗体価調査では、一定期間経過後のペア血清の検査が望ましいが、今回は推移を調べられる条件の血液の入手が困難であった。今後も当該検査を

続けて例数を増やし、データの蓄積を図りたい。

ワクチン接種前後の抗体価の推移について、9割以上が4倍以上の抗体価が上昇することが確認できた。一方で抗体価が上昇しない事例も存在することが確認できた。今後例数を増やし、上昇しない理由について情報を集積・解析する必要があると考える。

## E. 結論

メキシコ、米国からのブタ由来インフルエンザウイルスA/H1N1亜型の全世界的な流行が起これ、市衛研は感染症対策担当部局である保健所と連携をとり検査を実施すると共に、札幌市の対策においても連携や助言を行い、健康危機に対応した。

検査法については、高病原性鳥インフルエンザA/H5亜型を想定した検査体制が整備されていたことから、発生早期に検査可能となり、緊急性や検体数にあわせた組織体制で対応することができた。保健所の発熱相談センターでは市民や医療機関からの情報を集約し、市衛研へ検査依頼することから、市衛研との連絡体制が保健所 1 か所となり、混乱なく検査を実施できた。

札幌市の 1 例目の患者発生は6月11日であり、すでに発生していた他自治体の情報も十分得られ、適切な対応が可能であった。北海道は、学校の夏休み明けが8月中旬と早いこともあって、小中学校を中心とする流行が全国に先行したが、学級閉鎖等の措置を講じた結果、小児科での休日診療に混乱はあったものの、第1波は終焉した。

この間、定点ウイルスサーベイランスでインフルエンザの型別調査を精力的に実施し、新型を448件検出し、また、タミフル耐性解析も積極的に実施し、416検体中2株の耐性株を検出した。

新型インフルエンザウイルスに対する患者血清HI抗体価につて調査したところ、発症から9

日以上経過して採血された18試料の抗体価が、40～640倍の範囲であることが確認された。ワクチン接種前後の抗体価推移について、14名中13名の抗体価が4倍以上上昇していることが確認された。

今後、このウイルスが高病原性に変異する可能や薬剤耐性が高頻度になることも考えられることや、新たなA/H5亜型の感染拡大も考えられることから、ウイルスサーベイランスで状況を把握すると共に、情報を的確に迅速に提供する必要性を感じた。

今回のインフルエンザパンデミックは行政が科学的に立ち向かったモデルとして有意義なものであり、今後新たに発生するさまざまな健康危機に生かされていくことを望む。

#### **F. 参考文献**

なし

#### **G. 健康危機情報**

なし

#### **H. 研究発表**

(1) 村椿絵美他、2009/10 シーズン初のインフルエンザウイルス AH3 亜型分離—札幌市、病原微生物検出情報、30(11),297-298,2009

#### **I. 倫理面への配慮**

札幌市衛生研究所倫理審査委員会において、「新型インフルエンザ(pandemic H1N1 2009)患者の血清抗体価調査」及び「新型インフルエンザ(pandemic H1N1 2009)ワクチン接種前後の血清抗体価調査」について承認され、対象者から承諾書の提出を得て実施した。

#### **J. 知的財産権の出願、登録状況**

なし

表1 全数把握時の検査体制の確立①  
(24時間検査体制) : 5月28日～

検査人員	ウイルス担当者2名 一次応援 細菌担当者3名、感染症検査担当係長1名 二次応援 食品、保健、環境担当者6名
連絡体制	係長又は課長が保健所と搬入等の調整 検査開始時間は不定時で24時間の検査体制 休日は自宅待機、原則夜間の検査なし 1回の検査に当番制で1～2名
収集搬入	保健所医師が検体採取。一部発熱外来、医療機関で採取 保健所職員が公用車又はタクシーによる搬入
検査報告	係長、又は課長が保健所に検査のつど電話報告 成績書は庁内メール便

表2 全数把握時の検査体制の確立②  
(24時間検査体制) : 5月28日～

検査法	リアルタイムPCR(A、新型) Conv.PCR(AH1、AH3) 同時検査から、A陽性・新型陰性時のみConv.PCR実施に変更
検査機器	当初 リアルタイムPCR7500 1台 リアルタイムPCR7000 1台(食品用) Conv.PCR2台、抽出装置1台 追加 リアルタイムPCR7300 1台 (保健所市場検査係から借用:5/25～8/24) リアルタイムPCR7900 1台 (補正予算で購入:9/30納入)
処理能力	リアルタイムPCR 20検体/1回 5時間 最大検査回数 5回/日 最大100検体/日 Conv.PCR 1回/日 6時間

表3 新型インフルエンザ検査件数

	検査件数	新型	Aソ連型	A香港型	B型
全数把握 (4/28～7/24)	146	58	1	9	0
集団サーベイ ランス(7/29～ 8/24)	25	25	0	0	0
入院サーベイ ランス(7/27～ 12/31)	149	110	0	1	0
ウイルスサー ベイランス(3/27 ～12/31)	790	448	0	10	31
合計	1,110	641	1	20	31

表4 迅速診断キット偽陽性例

5~6月			7月		
PCR 迅速	-	+	PCR 迅速	-	+
A-	14*	1 <small>新型 0 香港型 1 ソ連型 0</small>	A-	22*	13 <small>新型 13 香港型 0 ソ連型 0</small>
A+	15	8 <small>新型 2 香港型 6 ソ連型 0</small>	A+	12	47 <small>新型 43 香港型 3 ソ連型 1</small>
AB+	1	0	AB+	2	0

\* 同一患者複数検査事例あり

表5 タミフル耐性インフルエンザA/H1N1sw1 (H275Y)解析

	新型陽性件数	解析実施件数	タミフル耐性
全数把握 (4/28~7/24)	58	54	0
集団サーベイ ランス(7/29~ 8/24)	25	23	0
入院サーベイ ランス(7/27~ 12/31)	110	56	0
ウイルスサー ベイランス(3/27 ~12/31)	448	283	2
合計	641	416	2

表6 タミフル耐性新型インフルエンザ患者情報(1例目)

採取日	8月22日(定点医療機関)
患者	12歳 女児
渡航歴	なし
家族歴	家族にインフルエンザ様症状なし
症状、経過	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 8月20日に咳症状、8月22日に発熱(38℃)あり、医療機関受診</li> <li>・ タミフル服用歴なし</li> <li>・ 検体採取後リレンザ服用: 1回2吸入、1日2回、5日分</li> </ul>
迅速診断検査	インフルエンザA陽性
自宅療養状況	23日に解熱、27日から登校・部活再開
患者周辺地域 状況	タミフル無効例や新型インフルエンザ患者の異常増加なし

表7 オセルタミビルおよびザナミビル感受性試験（1例目）  
（10/6/2009 国立感染研実施）

株名	亜型	H275Y	IC50 (nM)	
			オセルタミビル	ザナミビル
A/CALIFORNIA/07/2009Epdm*	H1N1pdm	275H	0.10	0.40
A/NARITA/1/2009Epdm*	H1N1pdm	275H	0.37	0.99
A/DENMARK/524/2009pdm*	H1N1pdm	275H	0.11	0.25
A/DENMARK/528/2009pdm*	H1N1pdm	275Y	35.65	0.45
A/SAPPORO-C/190/2009pdm	H1N1pdm	275Y	47.28	0.19
A/KITAKYUSYU/10/2006 (オセルタミビル陽性コントロール)	H1N1	275Y	173.36	-
季節性H1N1感受性株平均 (2007/08)	H1N1		0.10±0.06	0.35±0.23

H275Yの耐性マーカーを持つA/SAPPORO-C/190/2009pdmはこのマーカーを持たない国内、海外のH1N1pdmに比べオセルタミビルに対して感受性が著しく低下していた。オセルタミビルに対して感受性を持つ季節性H1N1株に比べると470倍近く感受性が低下していた。一方、ザナミビルに対しては感受性を保持していた。

表8 タミフル耐性新型インフルエンザ患者情報(2例目)

採取日	11月18日(定点医療機関)
患者	9歳 男児
渡航歴	なし
家族歴	患者の兄妹が11月17日以前に発症
症状、経過	・11月17日に発熱(39.8℃)し、タミフル(患者の兄妹が医療機関受信時に処方されたもの)の内服開始、11月18日医療機関受診
迅速診断検査	インフルエンザA陽性
患者周辺地域状況	タミフル無効例や新型インフルエンザ患者の異常増加なし

表9 オセルタミビルおよびザナミビル感受性試験(2例目)  
(1/21/2010 国立感染研実施)

株名	亜型	H275Y	IC50 (nM)	
			オセルタミビル	ザナミビル
A/CALIFORNIA/07/2009Epdm*	H1N1pdm	275H	0.10	0.40
A/NARITA/1/2009Epdm*	H1N1pdm	275H	0.37	0.99
A/SAPPORO/576/2009pdm	H1N1pdm	275Y	55.56	0.17
A/DENMARK/528/2009pdm (オセルタミビル陽性コントロール)	H1N1pdm	275Y	39.63	-
A/DENMARK/524/2009pdm (オセルタミビル陰性コントロール)	H1N1pdm	275H	0.09	-
IC50 平均値( A/H1N1pdm感受性株)			0.09±0.01	0.28±0.05

コメント: H275Yの耐性マーカーを持つA/SAPPORO/576/2009pdmはこのマーカーを持たないH1N1pdmに比べオセルタミビルに対して約550倍感受性が低下していた。一方、ザナミビルに対しては感受性を保持していた。

表10 発症から採血までの期間で分類した患者の抗体価

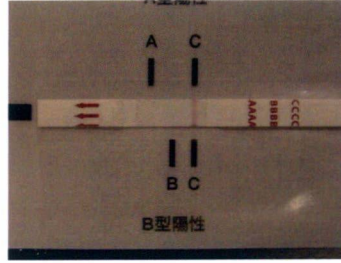
HI 抗体価(倍)	<10	10	20	40	80	160	320	640
～7 日後採血	8	1	2	0	0	0	0	0
8～14 日後採血	1	0	0	1	1	0	0	1
15～21 日後採血	0	0	0	1	0	1	0	0
22 日後以降採血	0	0	0	1	3	5	2	2
合計	9	1	2	3	4	6	2	3

表11 2回採血患者のHI抗体価推移

No.	1 回目 HI 抗体価	発症からの期間(日)	1 回目 HI 抗体価	発症からの期間(日)
1	<10	0	40	11
2	<10	0	160	41
3	<10	0	80	9
4	<10	2	<10	8
5	<10	1	<10	7
6	<10	1	10	7
7	10	1	320	23

5~6月

医療機関 迅速診断キット 結果		衛生研究所 迅速診断キット 結果		PCR検査 結果	
A+	23	+	7	+	7
				-	0
		-	16	+	1
				-	15



医療機関で陽性と判断しPCR検体が衛研に搬入された事例



医療機関でのキットの判定が未熟なための偽陽性と判断

図1 迅速診断キット陽性例の検討

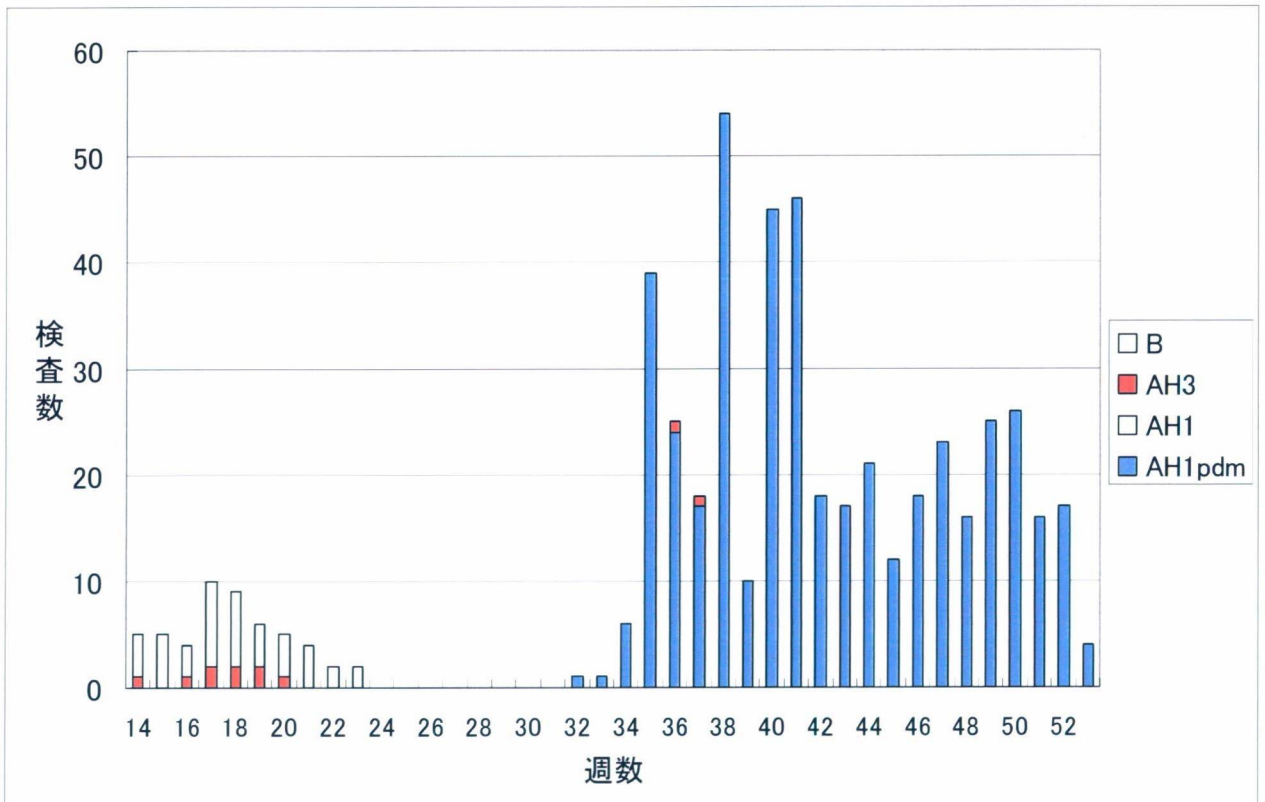


図2 検査定点ウイルスサーベイランス検査 (2009年4月~)



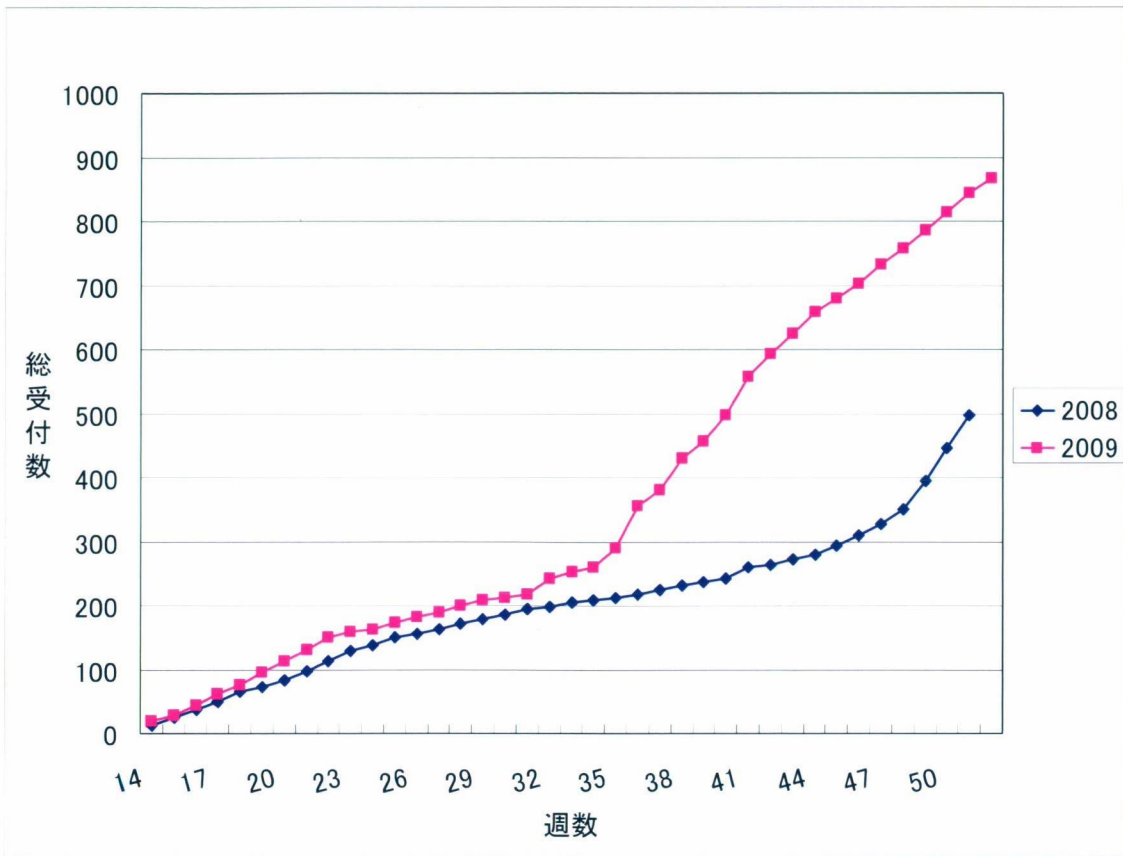


図3 感染症サーベイランス検体受付件数の推移 (2008,2009 比較)

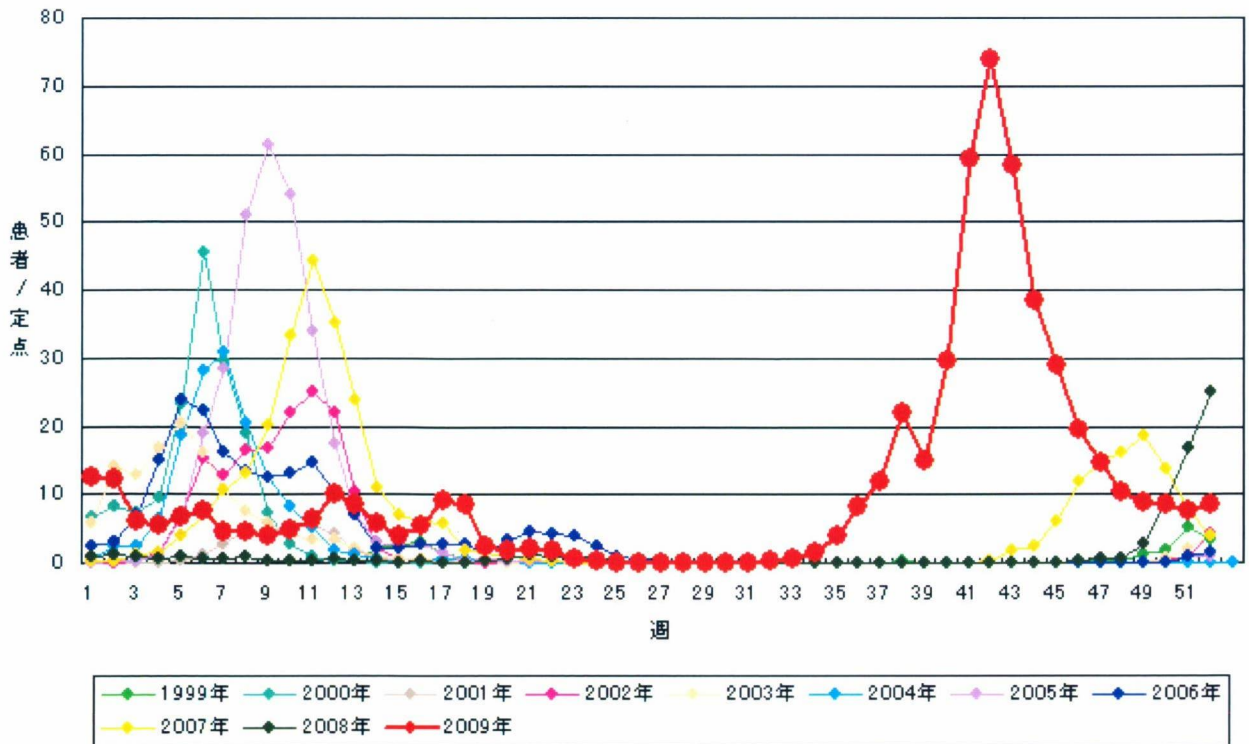


図4 インフルエンザ定点あたり報告数(札幌市)

抗体価(倍)

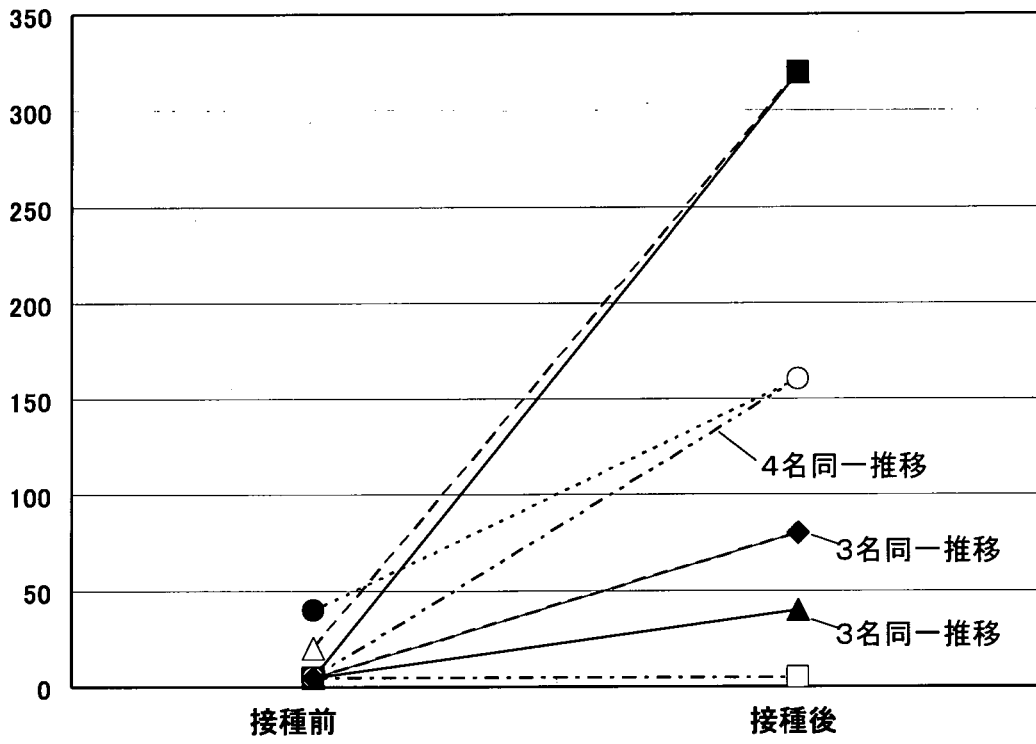


図5 ワクチン接種前後の抗体価推移

地方衛生研究所における検査能力の検証と今後の在り方検討  
分担研究報告書

**研究課題： LCR を用いた簡便なタミフル耐性鑑別法の開発**

研究協力者 斎藤 博之 (秋田県健康環境センター)  
研究分担者 田中 智之 (堺市衛生研究所)  
研究協力者 矢野 公一 (札幌市衛生研究所)  
研究協力者 中西 好子 (東京都健康安全研究センター)  
研究協力者 倉田 毅 (富山県衛生研究所)  
研究協力者 皆川 洋子 (愛知県衛生研究所)  
研究協力者 北堀 吉映 (奈良県保健環境研究センター)  
研究協力者 高橋 和郎 (大阪府立公衆衛生研究所)  
研究協力者 田中 敏嗣 (神戸市環境保健研究所)  
研究協力者 調 恒明 (山口県環境保健センター)  
研究協力者 平良 勝也 (沖縄県衛生環境研究所)

研究要旨: 新型インフルエンザ対策の一環として行われているウイルス学的サーベイランスにおいて、タミフル耐性を簡便な手順で鑑別できる方法を開発した。本法はリガーゼ連鎖反応 (LCR) を基本原理とし、A ソ連型と新型のタミフル感受性株と耐性株、合計 4 種類のノイラミニダーゼ (NA) 遺伝子を鑑別できるようにデザインした。複数の地方衛生研究所で実証評価試験を行ったところ、A ソ連型 95 検体、新型 158 検体において LCR による鑑別結果はシーケンス解析結果と完全に一致し、簡便法として有用であることが示された。また、LCR の反応系はどのような一塩基置換に対しても焦点を当ててデザインできるため、インフルエンザのタミフル耐性問題以外にも幅広く応用が可能であると考えられた。

**A. 研究目的**

2009 年 4 月のメキシコに端を発した新型インフルエンザ (A/H1N) の流行は、5 月の国内初発例を経て全国に拡大した。この間に様々な感染症対策が講じられたものの、医療分野における混乱に加えて社会的なパニックによる損失は非常に大きいものとなった。ワクチンの生産には時間を要するため、治

療薬であるタミフル (オセルタミビル) が対策の柱の一つとして位置付けられ、接触者等への予防投与も行われた。一方で、2007/2008 シーズンからタミフルに耐性を持つインフルエンザウイルス A ソ連型の割合が世界的に増加し、翌 2008/2009 年シーズンではほとんど全ての A ソ連型が耐性を獲得したことから、新型インフルエンザにおいても

同様の問題が危惧された。新型インフルエンザ対策の一環としてウイルス学的サーベイランスが実施され、その項目の中にタミフル耐性の調査が含まれているが、そのためにはノイラミニダーゼ(NA)遺伝子のシーケンスを決定し、マーカー部位(H275Y)の塩基置換(C→T)を確認する必要がある。しかしながら、前述のパニックにより、検査業務を直接担当する地方衛生研究所(地衛研)のマンパワーを遥かに凌駕する検体が連日頻回にわたって搬入されるに至り、シーケンスを確認する余裕が全く無いのが実状であった。また、インフルエンザのタミフル耐性問題以外でも、病原体遺伝子の一塩基置換を鑑別しなければならないケースは多数存在し、将来的に同様の局面が繰り返されるものと予想される。本研究では、こうした困難な状況を打開するために、任意の一塩基に焦点を当ててその置換を簡便に判定できる LCR (Ligase Chain Reaction : リガーゼ連鎖反応)に着目し、焦眉の急であったタミフル耐性鑑別用の反応系を開発した。開発に当たっては、すでにほぼ全てが耐性となっている A ソ連型と新型の交雑体が生じた場合も視野に入れ、4 種鑑別(A ソ連型・新型、それぞれの感受性ウイルス・耐性ウイルス)が行えることを目的とした。さらに、開発した検査プロトコルについて、地方衛生研究所全国協議会の各支部において実証評価試験を行い、様々な機関で幅広く用いられる手法となることを目指した。

## B. 研究方法

### 1. 研究材料

インフルエンザウイルス A ソ連型については MDCK 分離株として 50 株(感受性 10

株、耐性 40 株)を用いた。新型インフルエンザウイルスについては、MDCK 分離株として 10 株、鼻咽頭拭い液からの PCR 増幅産物として 32 検体を用いた(いずれも感受性)。また、実証評価試験のために秋田県以外の地衛研で用いた検体は表 6 に示した。なお、新型インフルエンザ耐性株のポジティブコントロールとして、大阪府で検出された国内初の耐性株の塩基配列 (Accession No.: GQ365445) を基に該当部分を機械的に合成した DNA 断片を用いた (図 2)。

### 2. 使用機器・試薬類

- (1) 耐熱性リガーゼ: 「9°N DNA Ligase」(NEB、コード#M0238S)
- (2) 高感度ゲル染色剤: 「GelRed」(ニッポンジーン、コード 518-24031)
- (3) アガロースゲル: 「Agarose 36GU」(フナコシ、コード GA-001)
- (4) 寒天末: 和光純薬、コード 016-11875
- (5) 合成オリゴ DNA: 表 1 に示すとおり (5'末端リン酸化 DNA は HPLC 精製グレード、他は簡易カートリッジ精製グレード)
- (6) RNA 抽出: 「QIAamp Viral RNA Mini Kit」(QIAGEN、コード 52906)
- (7) 逆転写酵素: 「ReverTra Ace」(東洋紡、コード TRT-101)
- (8) ランダムプライマー (タカラバイオ、コード 3802)
- (9) Taq DNA Polymerase (グライナー、コード TAQ-1)
- (10) サーマルサイクラー: アステック社製「PC320」

### 3. LCR の操作手順

本研究の全体のフローチャートを図 1 に示した。定法に従い、分離株または鼻咽頭拭い液からの RNA 抽出とランダムプライマーを用いた逆転写反応を行った。得られた cDNA に対して、3 種のプライマー「USSR-N1-FS」、「SW-N1-FS」、「H1N1-NA-R」を用いた PCR による予備増幅(94°C 30 秒-59°C 30 秒-72°C 30 秒、35 サイクル)を行い、エチジウムブロマイドを含む 2.5%アガロースゲル電気泳動で増幅バンドを確認した。増幅バンドの一部をシーケンス解析(グライナー社、プレミックス 8 連シーケンスサービス利用)にまわすのと同時に、増幅サイズに応じて A ソ連型、または新型の LCR によるタミフル耐性鑑別反応を行った(図 1)。

予備増幅において 275bp のバンドが認められた場合は、表 2 及び 3 に示す反応系を調製し、217bp のバンドが認められた場合は表 4 及び 5 に示す反応系を調製した。LCR による鑑別反応は、94°C 3 分 - 70°C 3 分を 1 サイクル行った後、94°C 30 秒 - 70°C 30 秒を 20 サイクル行った。その後、GelRed を含む 5%アガロースゲル(アガロース 2.5%、寒天末 2.5%の混合)で電気泳動を行い、50bp のプローブが結合して 99bp (1bp のオーバーラップ有り)になるかどうかを観察した。また、こうして得られた判定結果とシーケンスによって得られた塩基情報と比較して、正しく鑑別されているかどうかを確認した。

### 4. 実証評価試験の方法

上記の LCR のプロトコルを研究協力地衛

研に配布し、A ソ連型、及び新型インフルエンザのタミフル耐性マーカー H275Y の鑑別を行い、シーケンス解析で得られた結果と照合した。これによって、どの機関においても実施可能であることを確認した。

### C. 研究結果

#### 1. 予備増幅による A ソ連型と新型の鑑別

予備増幅の PCR において 3 種類のプライマーを使用することにより、A ソ連型では 275bp、新型で 217bp の増幅産物が得られるように反応系をデザインした。図 3 に示すように A ソ連型と新型は増幅サイズによって明瞭に区別できた。新型インフルエンザの検体であるにもかかわらず、A ソ連型の増幅サイズを示した場合(またはその逆)は、交雑体の可能性があるが現時点では観察されていない。

#### 2. LCR によるタミフル耐性の鑑別

予備増幅産物に対して LCR の鑑別反応を行った。ここでは、H 反応系(感受性株に反応)と Y 反応系(耐性株に反応)の両方を行い、プローブの結合の有無により H275Y に関する塩基置換を鑑別した。図 4 にはシーケンス解析でタミフル感受性と判定された A ソ連型 2 株と耐性と判定された 10 株について LCR の結果を示したが、前者は H 反応系でのみ、後者は Y 反応系でのみ結合プローブのバンドが観察された。同様に図 5 ではシーケンス解析でタミフル感受性と判定された新型 10 株と耐性株の塩基配列(図 2)を LCR で鑑別したが、前者は H 反応系でのみ、後者は Y 反応系でのみ結合プローブのバンドが認められた。図 6 には A ソ連型、及び新型の H 反応系と Y 反応系

の交叉試験結果を示したが、4種類の反応系はそれぞれ特異的で交叉しないことがわかった。

#### 4. LCRの実証評価試験

LCRによるH275Yの鑑別を11地衛研で行った結果を表6に示した。Aソ連型95検体、新型158検体について、LCRの結果はシーケンス解析の結果と完全に一致した。その一例として神戸市で行った鑑別反応の結果を図7に示した。結合プローブの有無によってH275Yを鑑別できていることがわかる。

#### D. 考察

新型インフルエンザ対策の一環としてウイルス学的サーベイランスがあり、その中にはタミフル耐性の調査が含まれている。しかしながら、流行期には膨大な検査業務のみならず、様々な問い合わせや会議等で忙殺されることが想定されるため、できるだけ簡便な手段でタミフル耐性鑑別を行えるようにするために本法を開発した。タミフル耐性の鑑別は特定の一塩基をチェックすればよいが、これまでに簡便な方法が存在しなかったためにシーケンス解析を余儀なくされていた。当センターでは、シーケンスの必要があるときにはグライナー社に外注(プレミックス8連シーケンスサービス)しているが、たとえ機器(シーケンサー)を保有する地衛研であったとしても、それを稼働させる時間や人員を確保するのは難しいのが実状である。すなわち、機器の使用前に、遺伝子の該当部分の増幅→電気泳動による確認→増幅断片の精製→電気泳動による再確認→定量→ジデオキシ反応→ローディ

ングサンプル調製といった手作業のプロセスが必要で、使用後も生データ(塩基配列)のトリミングや比較は手作業である(当然、検体数の分だけ必要)。さらに、こうした煩雑な作業と検査業務を同時に行うと、コンタミネーションによる検査ミスを起こすリスクも増大する。本研究では、任意の一塩基置換に焦点を当てられるLCRを用いて、簡便な検査法をデザインした。図1に示すとおり、予備増幅の段階でAソ連型と新型を区別し、続く鑑別反応でタミフル耐性マーカーを判定できるようにした。このプロトコルにより、Aソ連型と新型の交雑体も含めて4種鑑別が可能となった。本法はシーケンサー等の高価な大型機器を用いずとも実施できるため、国内の小規模な試験検査機関のみならず、途上国においても導入が容易である。また、LCRは任意の一塩基に対してデザインすることができるため、H275Y以外のマーカー部位、あるいは他の病原体での一塩基鑑別など応用範囲が広いものと考えられた。

#### 3. 実証評価試験

11地衛研において、Aソ連型95検体、新型158検体を用いて、LCRとシーケンス解析の結果を照合したところ全て一致していた。したがって、LCRは簡便な鑑別法として有用であると考えられる。複数の機関において特に深刻なトラブル無しに使用できたことで、今後は何らかの形でサーベイランスに取り入れることは意義があるものと思われる。なお、今後起こり得る問題点と対策は次のとおりである。

1) 同一検体でH検出系とY検出系の両方に反応する場合

臨床検体から直接遺伝子を増幅した場合

には、感受性ウイルスと耐性ウイルスが混ざっていることがあり、その場合は原理的に両方の検出系に反応する。シーケンス解析では解析ピークが重なって”N” (判定不能) になるなど曖昧な結果になる。分離株の場合は、どちらか一方のウイルスが培養されてくることが多い。

#### 2) 同一検体で H 検出系と Y 検出系のいずれにも反応しない場合

プローブの結合部位近傍に別の塩基置換が生じて障害となる可能性がある(現時点ではまだ例はない)。この場合は、予備増幅産物をシーケンス解析すれば原因が判明する。また、そのようなケースが多くなった場合には、障害となった部位を混合塩基にしたプローブを再デザインすればよい。

#### 3) 反応条件の最適化

各機関で用いられているサーマルサイクラーの温度制御には微妙な差があるため、本稿で示したプロトコルを基本に据えつつも、反応時間やサイクル数等を最適化しておくのが望ましい。

#### 4) LCR の結合プローブが薄い場合

実証評価試験において 99bp の LCR 結合プローブのバンドが薄くて観察しにくいとの指摘があった。原因は、低分子 DNA の電気泳動用に市販されているアガロースで 5%ゲルを作製すると、紫外線の自己吸収によって感度が低下するためである。ノーマルレンジ(200~1000bp 用)のアガロースと寒天末を 1:1 で混合したもので 5%ゲルを作製し、その際に高感度染色液である GelRed を使用することでこの問題を回避することができる。

#### 5) シーケンス解析との住み分け

ルーチン的には LCR を用いたサーベイラ

ンスを行い、上記 1)2) のようなケースでシーケンスを確認するのが現実的なプロセスと考えられる。すなわち、シーケンス解析を後詰めとしておけば、深刻な問題は発生しないため、安心して LCR を用いることができるようになる。

### E. 結論

新型インフルエンザの流行を経験したことで、地衛研として限られたリソースの中でウイルス学的サーベイランスを実施する必要性に迫られた。その一環として、LCR を用いてタミフル耐性を簡便に鑑別できる方法を開発した。本法により、A ソ連型と新型のタミフル感受性株と耐性株を同時に鑑別(4 種鑑別)できるようになった。また、複数の地衛研で実証評価試験を行ったところ、LCR の鑑別結果は完全にシーケンス解析の結果と一致し、簡便法として有用であることが示された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

準備中

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 合成する DNA の塩基配列

名前	修飾	配列 (5' → 3')	ポジション
USSR-N1-FS	なし	GAACCATAAAAAGTTGGA AAAAGC	641 → 664
SW-N1-FS	なし	TGTA AATGGTTCTTGCTTTACTG	699 → 721
H1H1-NA-R	なし	AGACACCCAMGGTCGATTYGA	894 ← 915
USSR-N1-C1	5'末端リン酸化	ATTATGAGGAATGYTCCTGTTACCCAGACACTGGCATAGTGATGTGTGT	824 → 872
USSR-N1-C2	5'末端リン酸化	AAAAKTGGGTGCATTCAACTCTATTGATTTAGTAACCTTCCCTTTTTCG	774 ← 822
USSR-N1-HD1	なし	TTAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCCAMTTTTTC	774 → 823
USSR-N1-HD2	なし	TTACACATCACTATGCCAGTGTCTGGGTAACAGGARCATTCTCATAATG	823 ← 872
USSR-N1-YD1	なし	TTAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCCAMTTTTT	774 → 823
USSR-N1-YD2	なし	TTACACATCACTATGCCAGTGTCTGGGTAACAGGARCATTCTCATAATA	823 ← 872
SW-N1-C1	5'末端リン酸化	ACTATGAGGAATGCTCCTGTTATCCTGATTCTAGTGAATCACATGTGT	824 → 872
SW-N1-C2	5'末端リン酸化	ATAATTAGGGGCATTCAATTCGACTGATTTGACTATCTTCCCTTTTCT	774 ← 822
SW-N1-HD1	なし	TTAAAAGGGGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATC	774 → 823
SW-N1-HD2	なし	TTACATGTGATTTCACTAGAATCAGGATAACAGGAGCATTCTCATAGTG	823 ← 872
SW-N1-YD1	なし	TTAAAAGGGGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATT	774 → 823
SW-N1-YD2	なし	TTACATGTGATTTCACTAGAATCAGGATAACAGGAGCATTCTCATAGTA	823 ← 872

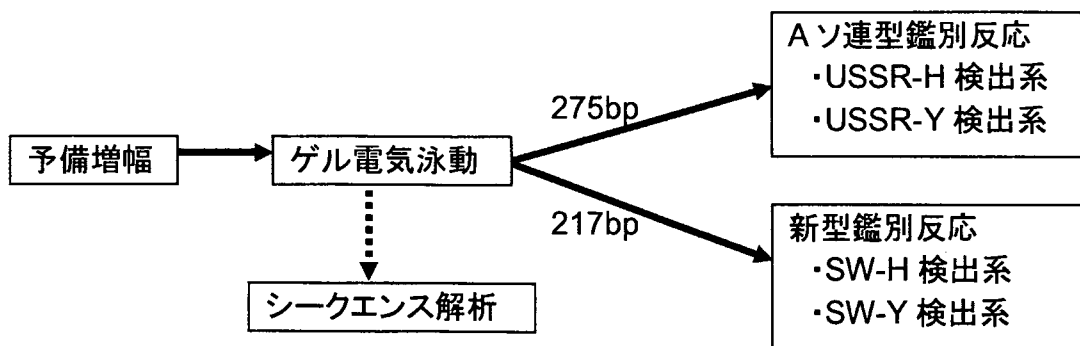


図 1 LCR によるタミフル耐性鑑別のためのフローチャート



表 2 USSR-H 検出系 (Aソ連型タミフル感受性型に反応する)

試薬類	使用量(μl)
DW	12.9
10× Buffer (添付)	2
USSR-N1-C1 (1μM)	1
USSR-N1-C2 (1μM)	1
USSR-N1-HD1 (1μM)	1
USSR-N1-HD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

表 3 USSR-Y 検出系 (Aソ連型タミフル耐性型に反応する)

試薬類	使用量(μl)
DW	12.9
10× Buffer (添付)	2
USSR-N1-C1 (1μM)	1
USSR-N1-C2 (1μM)	1
USSR-N1-YD1 (1μM)	1
USSR-N1-YD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

表 4 SW-H 検出系（新型タミフル感受性型に反応する）

試薬類	使用量(μl)
DW	12.9
10× Buffer（添付）	2
SW-N1-C1 (1μM)	1
SW-N1-C2 (1μM)	1
SW-N1-HD1 (1μM)	1
SW-N1-HD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

表 5 SW-H 検出系（新型タミフル耐性型に反応する）

試薬類	使用量(μl)
DW	12.9
10× Buffer（添付）	2
SW-N1-C1 (1μM)	1
SW-N1-C2 (1μM)	1
SW-N1-YD1 (1μM)	1
SW-N1-YD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

AGAACACAAG AGTCTGAATG TGCATGTGTA AATGGTTCTT GCTTTACTGT AATGACCGAT	60
GGACCAAGTA ATGGACAGGC CTCATACAAG ATCTTCAGAA TAGAAAAGGG AAAGATAGTC	120
AAATCAGTCG AAATGAATGC CCCTAATTAT <u>T</u> ACTATGAGG AATGCTCCTG TTATCCTGAT	180
TCTAGTGAAA TCACATGTGT GTGCAGGGAT AACTGGCATG GCTCGAATCG ACCGTGGGTG	240
TCT	243

図 2 新型耐性株を想定した合成 DNA (対照として使用)

Accession No.: GQ365445 の配列を基に、673~915 番塩基に相当する 243bp を機械的に合成した 2 本鎖 DNA である。下線部の "T" (上記の配列では 151 番目) が H275Y の鑑別部位に当たる。

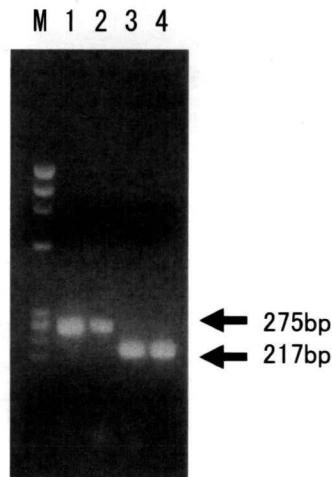


図 3 予備増幅産物のアガロースゲル(2.5%)電気泳動 (EtBr 染色)

M:  $\phi$ X174/HaeIII、1: Aソ連型感受性株、2: Aソ連型耐性株、3: 新型感受性株、3: 新型耐性株

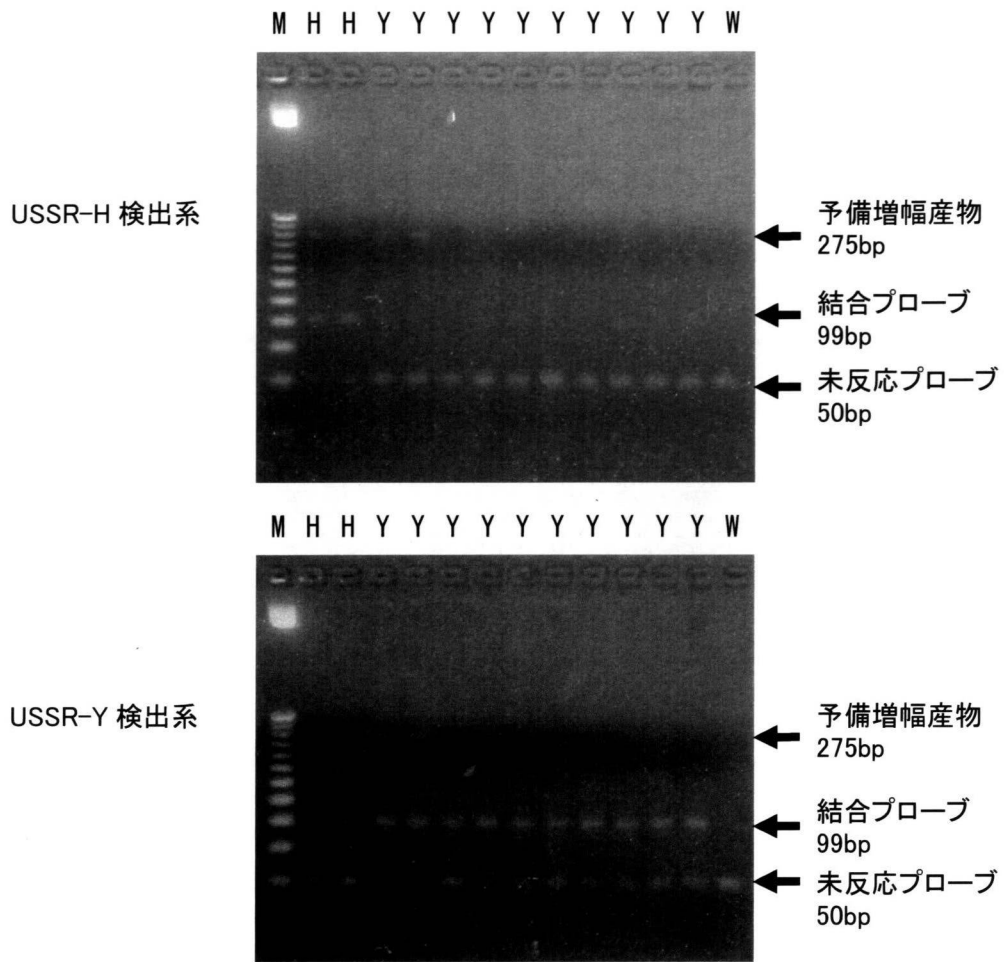


図4 Aソ連型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル(5%)電気泳動(GelRed染色)  
M: 25bp marker、H: Aソ連型感受性株、Y: Aソ連型耐性株、W: 蒸留水