

新型インフルエンザウイルスのタミフル耐性鑑別法の開発とその応用

斎藤博之 佐藤寛子 藤谷陽子 秋野和華子 千葉真知子 安部真理子

当センターでは、新型インフルエンザ（A/H1N1pdm09 型インフルエンザ）対応の一環として行われているタミフル耐性サーベイランスにおいて、ノイラミニダーゼ（NA）遺伝子の耐性マーカー部位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 A/H1N1pdm09 型のタミフル感受性ウイルスと耐性ウイルス、合計 4 種類の NA 遺伝子を鑑別できるようにデザインした。また、本法の応用例として、A 香港型と B 型のタミフル耐性マーカー部位の鑑別、及びウイルスの増殖能に関わる PB2 遺伝子の変異箇所の鑑別が行える反応系を構築した。A ソ連型 50 検体、A/H1N1pdm09 型 71 検体、A 香港型 85 検体、B 型 10 検体において LCR によるタミフル耐性マーカー部位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、PB2 遺伝子の変異箇所の識別も正しく行えることが確認された。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。

1. はじめに

2009 年 4 月のメキシコに端を発した新型インフルエンザ¹⁾（以降 A/H1N1pdm09 型と表記）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、A/H1N1pdm09 型インフルエンザにおいても同様の問題が危惧された。A/H1N1pdm09 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たが、その調査を実施する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）²⁾の塩基置換（C→T）を確認する必要があった。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npワ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³⁾。また、インフ

ルエンザのタミフル耐性問題以外にも、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訪れるものと予想された。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）⁴⁻⁶⁾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⁷⁾。開発に当たっては、既にほぼ全てが耐性となっている A ソ連型と A/H1N1pdm09 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・A/H1N1pdm09 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、他の型への応用例として A 香港型におけるタミフル耐性マーカー部位（E119V 変異と R292K 変異の 2 か所）⁸⁾、同じく B 型におけるマーカー部位（R150K 変異と D197N 変異の 2 か所）⁹⁾についても鑑別用の反応系を構築した。また、タミフル耐性以外の応用例として、インフルエンザウイルスのヒト体内における増殖能に関与するといわれている PB2 遺伝子の E627K 変異¹⁰⁾を検出する反応系も設計した。

2. 方法

2.1 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。A/H1N1pdm09 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 61 検体を用いた。A 香港型インフルエンザウイルスについては、MDCK 分離株として 38 株、鼻咽頭拭い液からの PCR 増幅産物として 47 検体を用いた。B 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 株を用いた。また、A/H1N1pdm09 型、A 香港型、B 型の耐性ウイルス対照として、GenBank に登録されている塩基配列を基に該当部分を機械的に合成した DNA 断片を用いた。

2.2 試薬類

2.2.1 耐熱性リガーゼ

「9° N DNA Ligase」(NEB, コード#M0238S)

2.2.2 高感度ゲル染色剤

「GelRed」(ニッポンジーン, コード 518-24031)

2.2.3 アガロースゲル

「Agarose 36GU」(フナコシ, コード GA-001)

2.2.4 寒天末

和光純薬, コード 016-11875

2.2.5 合成オリゴ DNA

表 1, 6, 9, 12 に示す塩基配列のとおり (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)

2.2.6 RNA 抽出

「QIAamp Viral RNA Mini Kit」(QIAGEN, コード 52906)

2.2.7 逆転写酵素

「ReverTra Ace」(東洋紡, コード TRT-101)

2.2.8 ランダムプライマー (タカラバイオ, コード 3802)

2.2.9 Taq DNA Polymerase (グライナー, コード TAQ-1)

2.3 LCR の操作手順

2.3.1 インフルエンザウイルス A ソ連型, 及び A/H1N1pdm09 型の場合

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。増幅産物は一部についてシーケンスを解析すると同時に、増幅サイズに応じて A ソ連型, または A/H1N1pdm09 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 275 bp 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、217 bp 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、50 bp のプローブが結合して 99 bp (1 bp 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。

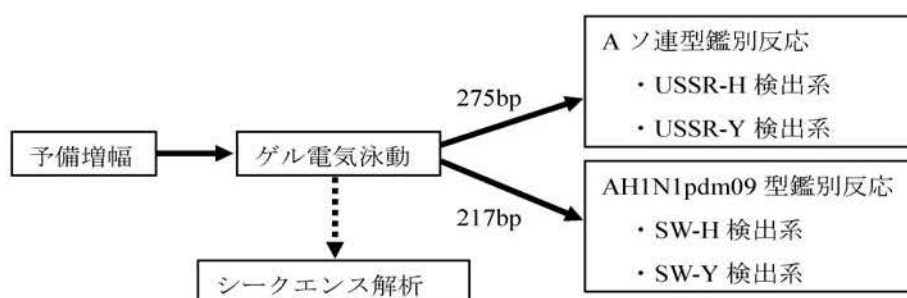


図 1 LCR によるタミフル耐性鑑別のためのフローチャート

2.3.2 インフルエンザウイルス A 香港型の場合

検体から抽出した RNA をもとに、ランダムプライマーを用いた逆転写反応によって cDNA を合成した (2.3.1 と同一の反応)。得られた cDNA に対して、プライマー「N2-F」と「N2-R」による予備増幅 (温度条件は 2.3.1 と同一) を行い、2.5%アガロースゲル電気泳動にて 698 bp のバンドを確認した。LCR によるタミフル耐性鑑別反応は表 7 及び 8 に示す反応系により行った。反応は「94℃ 3 分-65℃ 3 分」を 1 サイクル行った後、「94℃ 30 秒-65℃ 30 秒」を 20 サイクル行った。その後、GelRed を含む 5%アガロースゲルにて電気泳動を行い、結合プローブバンドの有無 (E119V 変異では 119 bp, R292K 変異では 99 bp) を観察した。また、この判定結果と、シーケンスによって得られた塩基情報を比較して正しく鑑別されているかを確認した。

2.3.3 インフルエンザウイルス B 型の場合

検体から抽出した RNA をもとに、ランダムプライマーを用いた逆転写反応によって cDNA を合成した (2.3.1 と同一の反応)。得られた cDNA に対して、プライマー「BN-F」と「BN-R」による予備増幅 (温度条件は 2.3.1 と同一) を行い、2.5%アガロースゲル電気泳動にて 318 bp のバンドを確認した。LCR によるタミフル耐性鑑別反応は表 10 及び 11 に示す反応系により行った (温度条件は 2.3.2 と同一)。その後、GelRed を含む 5%アガロースゲルにて電気泳動を行い、結合プローブバンドの有無 (R150K 変異では 119 bp, D197N 変異では 99 bp) を観察した。また、この判定結果と、シーケンスによって得られた塩基情報を比較して正しく鑑別されているかを確認した。

2.3.4 インフルエンザウイルス PB2 遺伝子変異の場合

検体から抽出した RNA をもとに、ランダムプライマーを用いた逆転写反応によって cDNA を合成した (2.3.1 と同一の反応)。得られた cDNA に対して、プライマー「PB2-F」と「PB2-R」による予備増幅 (温度条件は 2.3.1 と同一) を行い、2.5%アガロースゲル電気泳動にて 318 bp のバンドを確認した。LCR によるトリ型かヒト型かの鑑別反応は表 13 及び 14 に示す反応系により

行った。反応の温度条件 94℃ 3 分-70℃ 3 分を 1 サイクルに続き、94℃ 30 秒-65℃ 2 分を 20 サイクル行った。その後、GelRed を含む 5%アガロースゲルにて電気泳動を行い、99 bp の結合プローブバンドの有無 (トリ型では E627 検出系, ヒト型では K627 検出系に出現) を観察した。また、この判定結果と、シーケンスによって得られた塩基情報を比較して正しく鑑別されているかを確認した。

3. 結果

3.1 インフルエンザウイルス A ソ連型、及び A/H1N1pdm09 型における耐性鑑別

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 275 bp, 新型で 217 bp の増幅産物が得られるように反応系をデザインした。図 2 に示すように A ソ連型と A/H1N1pdm09 型は増幅サイズによって明瞭に区別できた。A/H1N1pdm09 型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。

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 (タミフル感受性株に反応) と Y 反応系 (タミフル耐性株に反応) 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 3 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 4 ではシーケンス解析でタミフル感受性と判定された A/H1N1pdm09 型 12 株と、対照として化学合成した耐性株の塩基配列を 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 5 には A/H1N1pdm09 型、及びの A ソ連型の 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。

A ソ連型のタミフル感受性株 10 株と、耐性株 40 株について本法による鑑別を試みたところ、シーケンス解析によって得られた結果と一致した。A/H1N1pdm09 型の 71 検体 (分離株 10,

PCR 増幅産物 61) については、本法を用いるこ
とで 2 検体 (図 6,7) から耐性ウイルスを検出し、

他は感受性のウイルスであった。シーケンス
解析で確認した結果とも一致していた。

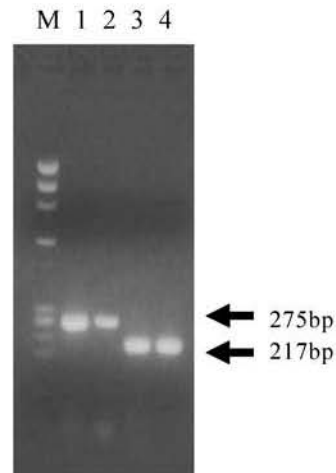


図 2 予備増幅産物のアガロースゲル電気泳動

M: ϕ X174/HaeIII, 1: A ソ連型感受性株, 2: A ソ連型耐性株,
3: A/H1N1pdm09 型感受性株, 4: A/H1N1pdm09 型耐性株配列 (化学合成 DNA)

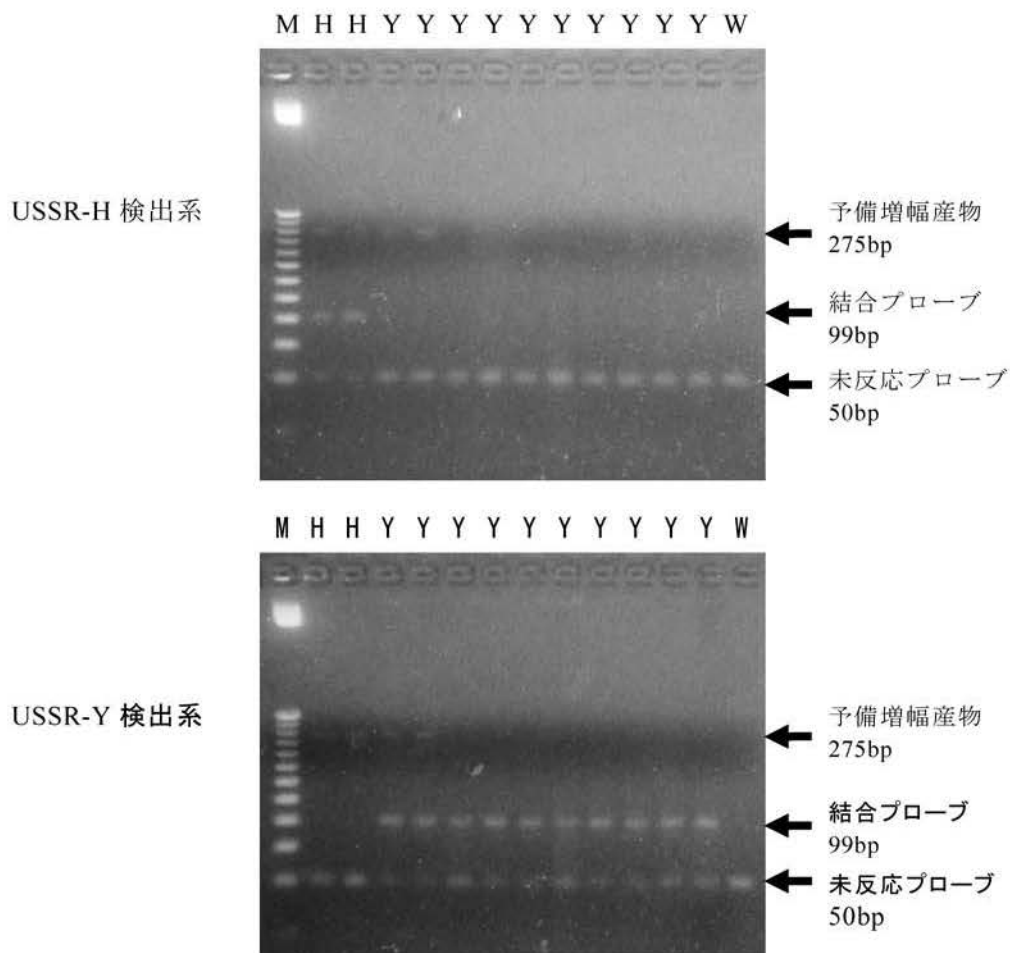


図 3 A ソ連型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M: 25bp marker、H: A ソ連型感受性株、Y: A ソ連型耐性株、W: 蒸留水

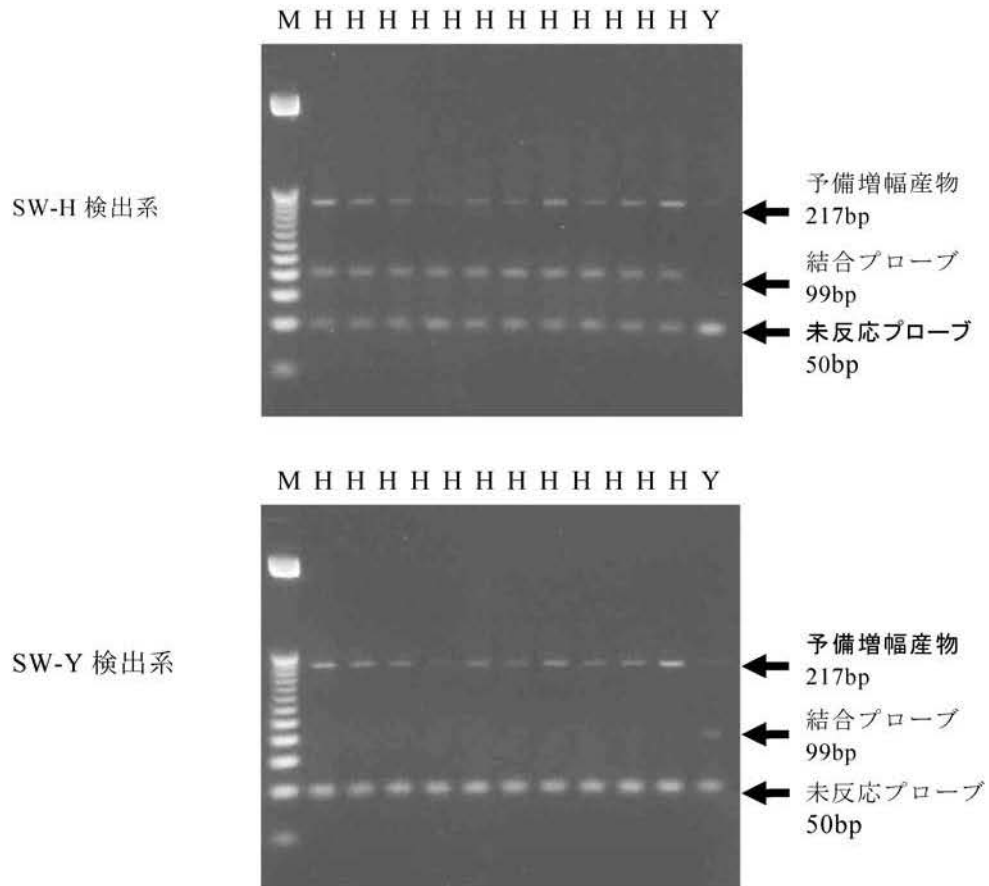


図 4 A/H1N1pdm09 型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動
M: 25bp marker、H:A/H1N1pdm09 型感受性株、Y: A/H1N1pdm09 型耐性株配列（化学合成 DNA）

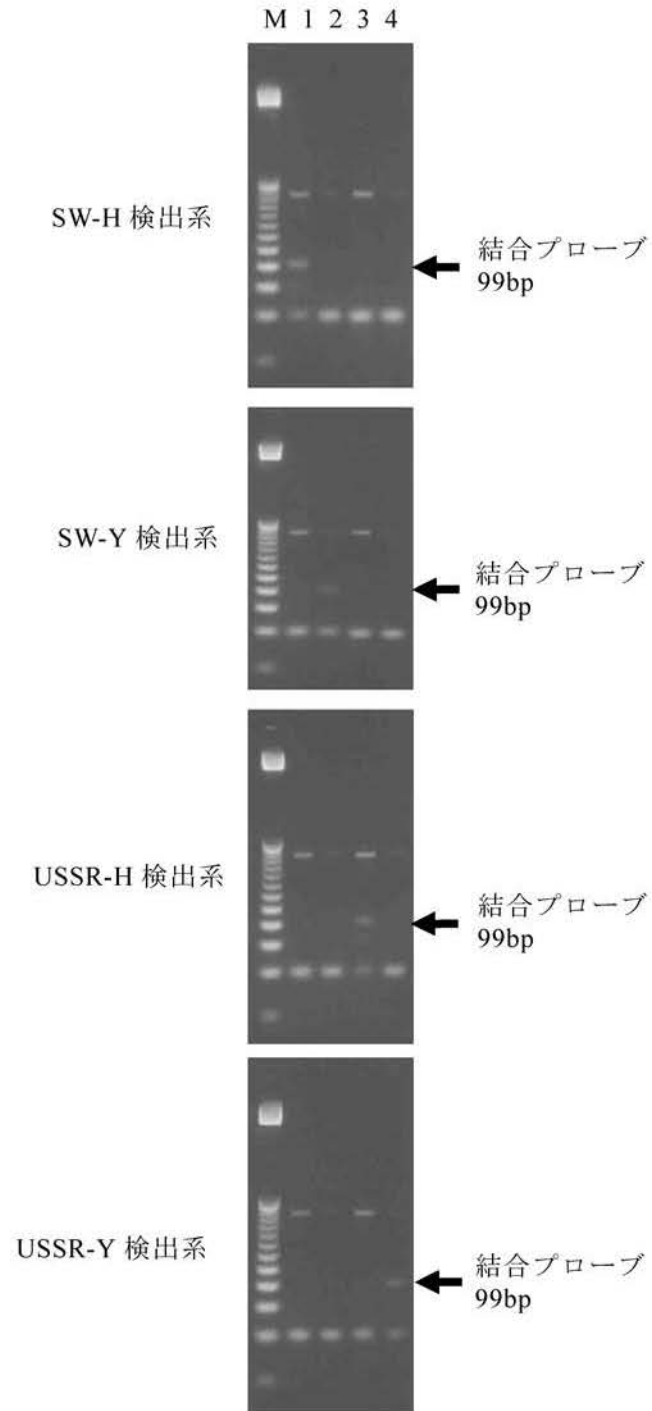


図5 A/H1N1pdm09 型と A ソ連型との交叉反応
M: 25bp marker, 1: A/H1N1pdm09 型感受性株,
2: A/H1N1pdm09 型耐性株配列 (化学合成 DNA),
3: A ソ連型感受性株, 4: A ソ連型耐性株

SW-Y 検出

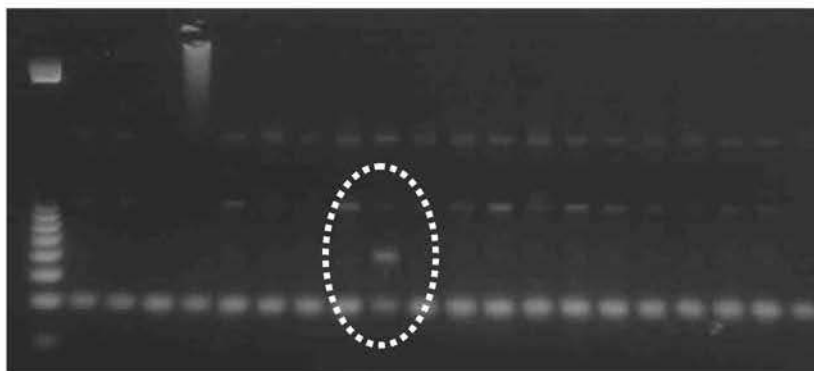


図6 秋田県で検出されたタミフル耐性ウイルス（実例1）

平成22年1月25日採取：横手保健所からの行政依頼（福祉施設）

SW-Y 検出系



図7 秋田県で検出されたタミフル耐性ウイルス（実例2）

平成22年2月3日採取：感染症発生動向調査対象医療機関

3.2 インフルエンザウイルス A 香港型における耐性鑑別

インフルエンザウイルス A 香港型については、タミフル耐性鑑別においてよく用いられる2か所のマーカー部位（E119V 変異，R292K 変異）を同時に検出できる反応系を構築した。どちらのマーカー部位も感受性であった場合には E119-R292 検出系のアガロースゲルに2本の結合プローブのバンドが出現する（図8 レーン A）。これらの内、一方が耐性であった場合には、該当するバンドが E119-R292 検出系から消えて、V119-K292 検出系の方に出現する（図8 レーン B, C）。両方が耐性であった場合には V119-K292 検出系に2本のバンドが出現する（図8 レーン D）。図8に示した検体（レーン1～8）はいずれも E119-R292 検出系の方に2本のバンドが認められたため、感受性であると判定された。全部で85検体（分離株38，PCR増幅産物47）

について本法を試みたところ、全て感受性であり、シーケンス解析の結果とも一致した。

3.3 インフルエンザウイルス B 型における耐性鑑別

インフルエンザウイルス B 型については、タミフル耐性鑑別においてよく用いられる2か所のマーカー部位（R150K 変異，D197N 変異）を同時に検出できる反応系を構築した。どちらのマーカー部位も感受性であった場合には R150-D197 検出系のアガロースゲルに2本の結合プローブのバンドが出現する（図9 レーン A）。これらの内、一方が耐性であった場合には、該当するバンドが R150-D197 検出系から消えて、K150-N197 検出系の方に出現する（図9 レーン B, C）。両方が耐性であった場合には K150-N197 検出系に2本のバンドが出現する（図9 レーン D）。図9に示した検体（レーン1～4）はいずれも R150-D197 検出系の方に2本のバン

ドが認められたため、感受性であると判定された。MDCK 分離株 10 株について本法を試みたと

ころ、全て感受性であり、シーケンス解析の結果とも一致した。

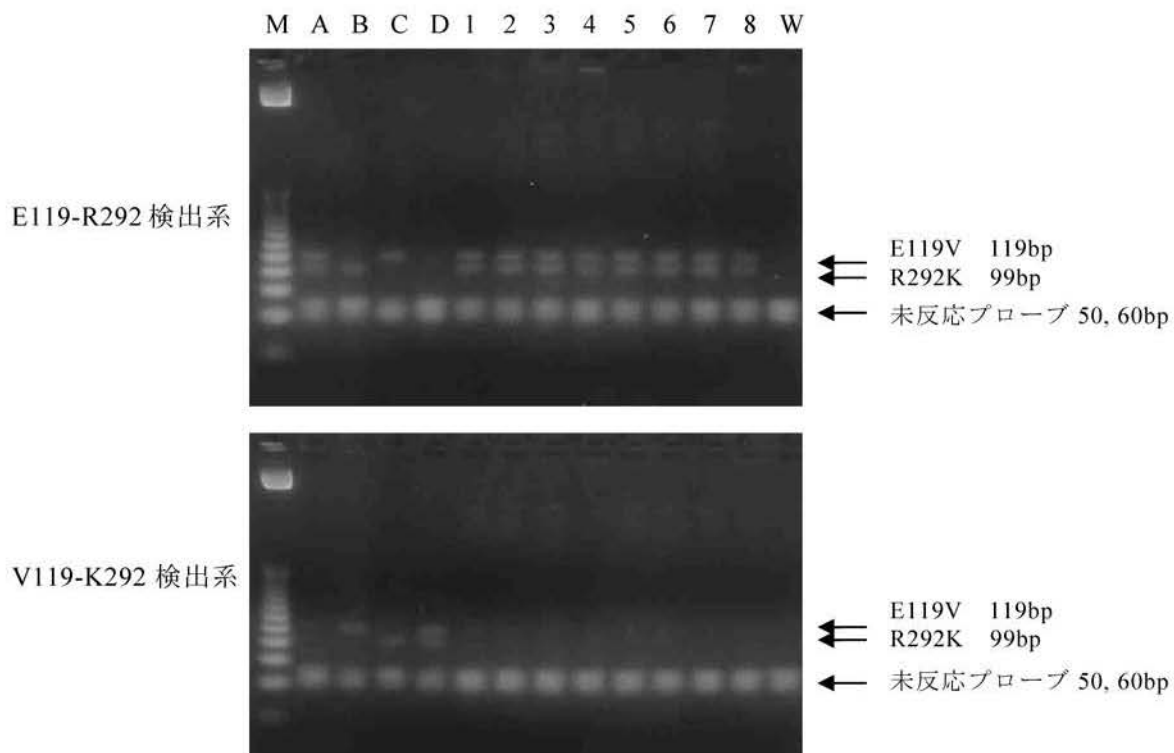


図 8 A 香港型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M : 25bp Ladder, A : 両方感受性, B : E119V 耐性, C : R292K 耐性, D : 両方耐性, 1~8 : T 病院患者由来ウイルス, W : 蒸留水

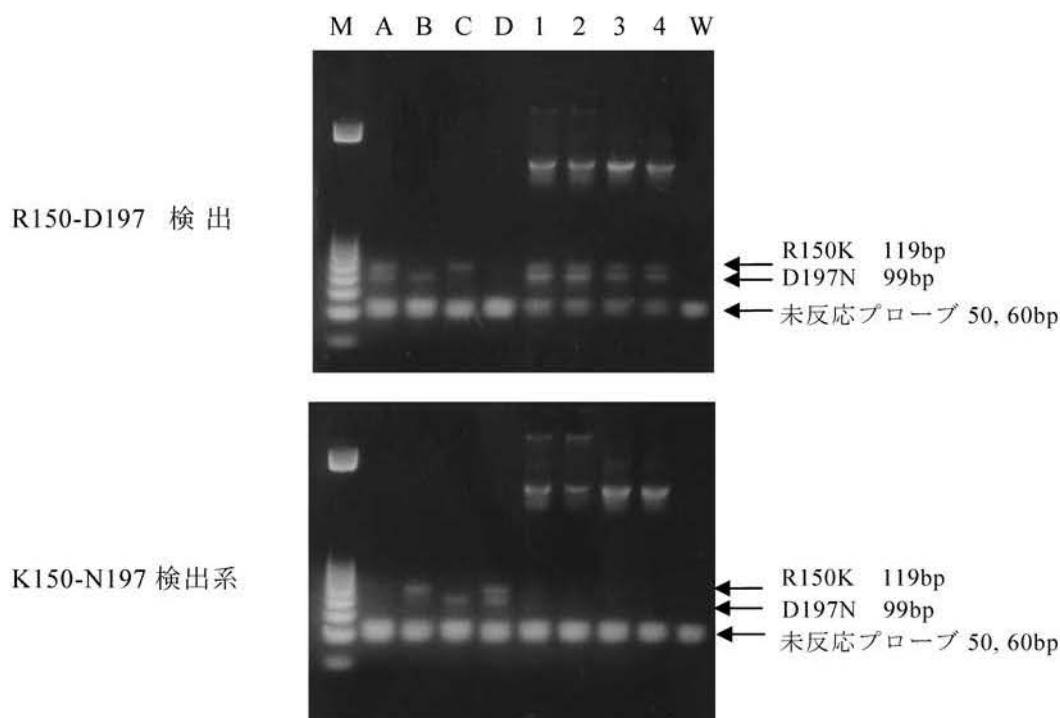


図 9 B 型タミフル耐性鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M : 25bp Ladder, A : 両方感受性, B : R150K 耐性, C : D197N 耐性, D : 両方耐性, 1~4 : 感染症発生動向調査対象医療機関由来ウイルス, W : 蒸留水

3.4 インフルエンザウイルス PB2 遺伝子変異の検出

A/H1N1pdm09 型インフルエンザウイルスの増殖能に関わる PB2 遺伝子はトリ由来であることから、増殖のための至適温度が、トリの体温（42℃）に近いことが知られている。従って、PB2 遺伝子の変異によってヒト型の塩基配列に変わった場合には、増殖至適温度が低下して、ヒトの体内で増えやすいウイルスが出現することが危惧されている。LCR による一塩基鑑別の

応用例として、PB2 遺伝子の該当部分を識別する反応系を構築した。図 10 に示したとおり、トリ型の PB2 遺伝子を有する A/H1N1pdm09 型では、E627 検出系の方に結合プローブのバンドが現れた（図 10 レーン 1）。一方、すでにヒトの間で流行が繰り返されている A ソ連型と A 香港型は、K627 検出系の方にバンドが認められた（図 10 レーン 2, 3）。シーケンス解析の結果とも一致した。

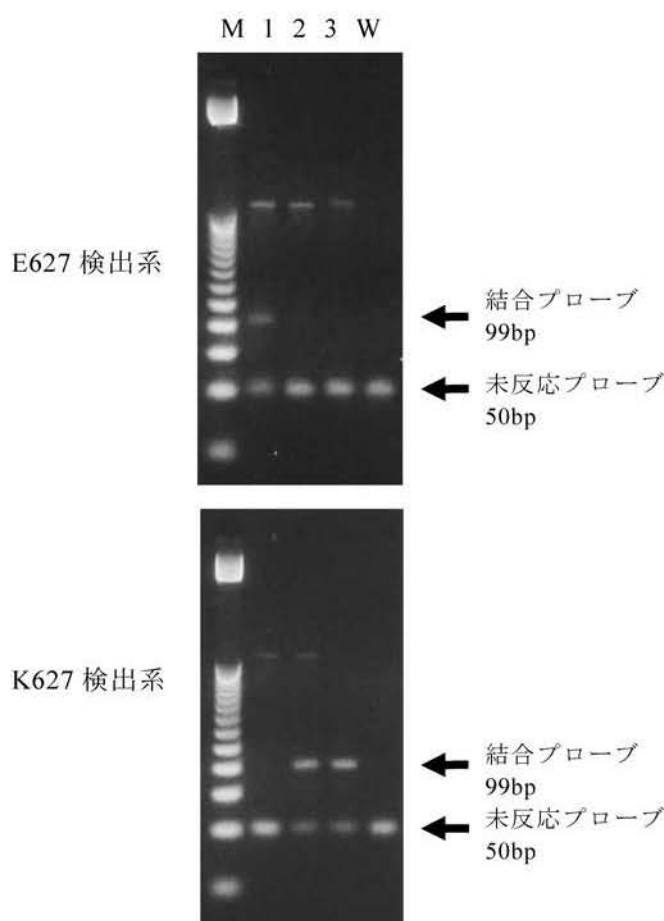


図 10 PB2 遺伝子 E627K 変異鑑別反応産物のアガロースゲル電気泳動

M: 25bp marker、1: A/H1N1pdm09 型、2: A ソ連型、3: A 香港型、W: 蒸留水

4. 考察

4.1 インフルエンザウイルス A ソ連型、及び A/H1N1pdm09 型における LCR 反応系の開発

タミフルの世界在庫の 7 割が我が国において用いられている現状から、感染症発生動向調査には耐性のサーベイランスが含まれている。タミフルの標的となるノイラミニダーゼの遺伝子には耐性に関与するマーカー部位が知られており、その部分のシーケンスを解析することに

よって市中に流行しているタミフル耐性ウイルスの判定が可能である。一方、シーケンス解析のためには、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、その後も生データ（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 A/H1N1pdm09 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。この手法により、A ソ連型と A/H1N1pdm09 型の交雑体も含めて 4 種鑑別が可能となった。本研究では A ソ連型 50 検体、A/H1N1pdm09 型 71 検体について LCR とシーケンス解析の結果を照合し、両者が一致していることが確認できた。その過程で 2 検体から A/H1N1pdm09 型の耐性ウイルスを検出することができ、実践的な使用に耐えるものと考えられた。

4.2 LCR による一塩基鑑別の応用

インフルエンザウイルス A 香港型と B 型についてもタミフル耐性ウイルスは存在し、そのマーカー部位も知られている。A ソ連型や A/H1N1pdm09 型は一か所の塩基を鑑別すればよいのに対し、A 香港型と B 型の場合は、よく用いられるマーカー部位は 2 か所である。本研究では、長さの異なる 2 種類の結合プローブを検出することで、いずれか一方、あるいは両方のマーカー部位が耐性となっているかどうかを区別できる反応系を開発することができた（図 8, 9）。平成 22～23 年には A 香港型と B 型の耐性ウイルスは検出されなかったが、平成 22 年 11 月に発生した、死者 8 名を含む院内感染事例（図 8 レーン 1～8）では住民不安の解消に役立った。

タミフル耐性鑑別以外への応用例として、インフルエンザウイルスの増殖能に関わる PB2 遺伝子の一塩基置換を識別する反応系を開発した（図 10）。A/H1N1pdm09 型はトリ由来の PB2 遺伝子を保有しており、ヒトの間で流行が繰り返されている A ソ連型や A 香港型とは異なることがわかる。

4.3 LCR による一塩基鑑別の特長

本法以外にタミフル耐性鑑別に用いられている方法としては、TaqMan プローブ法¹¹⁻¹³⁾とサイクリングプローブ法¹⁴⁾がある。いずれも Real-time PCR 装置を用いるが、A ソ連型と

A/H1N1pdm09 型の反応系しかなく、新規の反応系をデザインするのに時間を要する。また、前者は専用の試薬を国立感染症研から供給してもらう必要があるため、地方衛生研究所以外の試験研究機関では制約が伴う。本研究で検討した LCR は任意の一塩基に対してデザインすることが容易なため、A/H1N1pdm09 型以外のタミフル耐性鑑別、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という特長がある。また、一つの検体にタミフル感受性ウイルスと耐性ウイルスが混在している場合には、シーケンス解析、TaqMan プローブ法、サイクリングプローブ法のいずれもが判定不能になることが多いが、LCR ならば問題なく判定できる（図 3, 4 の場合は H 検出系と Y 検出系の両方に結合プローブバンドが出現する）。さらに、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。本法は反応系デザインが容易であることや、試薬の入手に特段の制限がないことから、何らかの鑑別を必要とする局面の初期段階（マニュアルが整っていない段階）における柔軟な対応に役立つものと考えられた。

参考文献

- 1) Center for Disease Control and Prevention: Update: novel influenza A (H1N1) virus infections – worldwide, May 6, 2009. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep **58**, 2009, 453-458.
- 2) Gubareva L, et. al.: Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. J. Infect. Dis. **183**, 2001, 523-531.
- 3) 斎藤博之, 他: 秋田県における新型インフルエンザ(A/H1N1)発生への検査, 調査についての準備及び初期対応状況について, 厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業「新型インフルエンザ (インフルエンザ A/H1N1sw1) 発生への検査, 調査についての準備及び初期対応の総括と, 病原体検査や感染者調査に関する今後の国と地方との連携強化及び対応能力強化に関する緊急研究 平成 21 年度総括・分担研究報告書, 2010

- 4) Barany, F, et. al.: Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Prot. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1991, 189-193.
- 5) Barany, F, et. al.: The ligase chain reaction in a PCR world. *PCR Methods Appl.* **1**, 1991, 5-16.
- 6) Tooley, PW, et. al.: Use of ligase chain reaction for enhanced detection of *Phytophthora infestans*. *Can. J. Pathol.* **24**, 2002, 294-301.
- 7) 斎藤博之,他: LCR を用いた簡便なタミフル耐性鑑別法の開発, 厚生労働科学研究費補助金 厚生労働科学特別研究事業「新型インフルエンザ (インフルエンザ A/H1N1sw1) 発生への検査, 調査についての準備及び初期対応の総括と, 病原体検査や感染者調査に関する今後の国と地方との連携強化及び対応能力強化に関する緊急研究 平成 21 年度総括・分担研究報告書, 2010
- 8) Zuercher T, et. al.: Mutations conferring zanamivir resistance in human influenza virus N2 neuraminidases compromise virus fitness and are not stably maintained in vitro. *J. Antimicrobiol. Chem.* **58**, 2006, 723-732.
- 9) Oakley AJ, et. al.: Structural and functional basis of resistance to neuraminidase inhibitors of influenza B viruses. *J. Med. Chem.* **53**, 2010, 6421-6431.
- 10) Aggarwal S, et. al.: Biochemical Impact of the Host Adaptation-associated PB2 E627K Mutation on the Temperature-dependent RNA Synthesis Kinetics of Influenza A Virus Polymerase Complex. *J. Biol. Chem.* **286**, 2011, 34504-34513.
- 11) Hindiyeh M, et. al.: Rapid detection of influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus neuraminidase resistance mutation H275Y by real-time reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2010, 1884-1887.
- 12) Ujike M, et.al.: Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1) during 2007-2009 influenza seasons, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 2010, 926-935.
- 13) van der Vries E, et. al.: Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. *J. Clin. Virol.* **47**, 2010, 34-37.
- 14) Suzuki Y, et. al.: Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal influenza A (H1N1) viruses by an His275Tyr genotyping assay using the cycling probe method. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2011, 125-130.

表1 インフルエンザウイルス A ソ連型、
及び A/H1N1pdm09 型の NA 遺伝子に用いる合成 DNA

名前	修飾	配列 (5'→3')	ポジション
USSR-N1-FS	なし	GAACCATAAAAAGTTGGAAAAAGC	641 → 664
SW-N1-FS	なし	TGTAAATGGTTCCTTGTCTTACTG	699 → 721
H1H1-NA-R	なし	AGACACCCAMGGTCGATTYGA	894 ← 915
USSR-N1-C1	5'末端リン酸化	ATTATGAGGAATGYTCCTGTACCCAGACACTGGCATAGTGATGTGTGT	824 → 872
USSR-N1-C2	5'末端リン酸化	AAAAKTGGGTGCATTCAACTCTATTGATTAGTAACCTTCCCTTTTCG	774 ← 822
USSR-N1-HD1	なし	TTAAAAGGGGAAGGTTACTAAATCAATAGAGTTGAATGCACCCAMTTTTC	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	ACTATGAGGAATGCTCCTGTATCCTGATTCTAGTGAATACATGTGT	824 → 872
SW-N1-C2	5'末端リン酸化	ATAATTAGGGGCATTCAATTCGACTGATTGACTATCTTTCCCTTTTCT	774 ← 822
SW-N1-HD1	なし	TTAAAAGGGGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATC	774 → 823
SW-N1-HD2	なし	TTACATGTGATTTCACTAGAAATCAGGATAACAGGAGCATTCTCATAGTG	823 ← 872
SW-N1-YD1	なし	TTAAAAGGGGAAGATAGTCAAATCAGTCGAAATGAATGCCCTAATTATT	774 → 823
SW-N1-YD2	なし	TTACATGTGATTTCACTAGAAATCAGGATAACAGGAGCATTCTCATAGTA	823 ← 872

・ポジションは GenBank Accession No.: FJ966973 に記載のある遺伝情報の塩基番号と合成の方向 (矢印) を示す。

表2 USSR-H 検出系

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

・ A ソ連型タミフル感受性型に反応する

表3 USSR-Y 検出系

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

・ A ソ連型タミフル耐性型に反応する

表4 SW-H 検出系

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

・ A/H1N1pdm09 型タミフル感受性型に反応する

表5 SW-Y 検出系

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

・ A/H1N1pdm09 型タミフル耐性型に反応する

表6 インフルエンザウイルス A 香港型の NA 遺伝子に用いる合成 DNA

名前	修飾	配列 (5'→3')	ポジション
N2-F	なし	TACAGGATTGACCTTTTCTAA	282 → 305
N2-R	なし	TGGGTGTGTCTCCRACAAGTC	959 ← 979
E119V-N2-C1	5'末端リン酸化	ACCTTATGTGTCATGCGATCCTGACAAGTGTATCAATTTGCCCTTGGRCAAGGGAACAA	357 → 415
E119V-N2-C2	5'末端リン酸化	CTCTTGTCACCCAGATGTCCCCACCAGCGAAAGCCKAATCGAATGTCTTAGAAAAA	297 ← 355
E119V-N2-ED1	なし	TTTTCTAAGGACAATTCGATTMGCTTTCCGCTGGTGGGACATCTGGGTGACAAGAGA	297 → 356
E119V-N2-ED2	なし	TGTTCCCTGYCCAAGGGCAAATTGATAACACTTGTCAGGATCGCATGACACATAAGGTT	356 ← 415
E119V-N2-VD1	なし	TTTTCTAAGGACAATTCGATTAGGCTTTCCGCTGGTGGGACATCTGGGTGACAAGAGT	297 → 356
E119V-N2-VD2	なし	TGTTCCCTGYCCAAGGGCAAATTGATAACACTTGTCAGGATCGCATGACACATAAGGTA	356 ← 415
R292K-N2-C1	5'末端リン酸化	AGACAACCTGGAAGGCTCCAATAGGCCCATHTAGATATAAACATAAAG	876 → 924
R292K-N2-C2	5'末端リン酸化	TGCAGACACATCTGACACCAGGATATCGAGGATARCAGGAGCACTCCTC	826 ← 874
R292K-N2-RD1	なし	GAGGAGTGCTCCTGYTATCCTCGATATCTGGTGTGATGTGTCTGCAG	826 → 875
R292K-N2-RD2	なし	CTTTATGTTTATATCTACDATTGGGCTATTGGAGCCTTTCCAGTTGTCTC	875 ← 924
R292K-N2-KD1	なし	GAGGAGTGCTCCTGYTATCCTCGATATCTGGTGTGATGTGTCTGCAA	826 → 875
R292K-N2-KD2	なし	CTTTATGTTTATATCTACDATTGGGCTATTGGAGCCTTTCCAGTTGTCTT	875 ← 924

・ ポジションは GenBank Accession No.: CY035024 に記載のある遺伝情報の塩基番号と合成の方向 (矢印) を示す。

表 7 E119-R292 検出系

試薬類	使用量 (μl)
DW	8.9
10× Buffer (添付)	2
E119V-N2-C1 (1μM)	1
E119V-N2-C2 (1μM)	1
R292K-N2-C1 (1μM)	1
R292K-N2-C2 (1μM)	1
E119V-N2-ED1 (1μM)	1
E119V-N2-ED2 (1μM)	1
R292K-N2-RD1 (1μM)	1
R292K-N2-RD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・ A 香港型タミフル感受性型に反応する

表 8 V119-K292 検出系

試薬類	使用量 (μl)
DW	8.9
10× Buffer (添付)	2
E119V-N2-C1 (1μM)	1
E119V-N2-C2 (1μM)	1
R292K-N2-C1 (1μM)	1
R292K-N2-C2 (1μM)	1
E119V-N2-VD1 (1μM)	1
E119V-N2-VD2 (1μM)	1
R292K-N2-KD1 (1μM)	1
R292K-N2-KD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・ A 香港型タミフル耐性型に反応する

表 9 インフルエンザウイルス B 型の NA 遺伝子に用いる合成 DNA

名前	修飾	配列 (5'→3')	ポジション
BN-F	なし	GATAATAAGGGAACCTTTTATTC	346 → 369
BN-R	なし	TTTGCATAGGAATGGTATGTGCA	639 ← 663
R150K-BN-C1	5'末端リン酸化	AAACAAGCTGAGGCATCTRATTTTCAGTCAAMTTTGGCAAAATCCCAACWGTAGAAAAC	457 → 515
R150K-BN-C2	5'末端リン酸化	TGTCYYCTCTTKTTCCATTGTAGTATCCCCCTGGTTGRGCTGCATARTGGGTTAGAGCA	397 ← 455
R150K-BN-RD1	なし	TGCTCTAACCCAYTATGCAGCYCAACCAGGGGGATACTACAATGGAAMAAGAGRRGACAG	397 → 456
R150K-BN-RD2	なし	AGTTTTCTACWGTTGGGATTTTGCCYAAKTTGACTGAAATYAGATGCCTCAGCTTGTTTC	456 ← 515
R150K-BN-KD1	なし	TGCTCTAACCCAYTATGCAGCYCAACCAGGGGGATACTACAATGGAAMAAGAGRRGACAA	397 → 456
R150K-BN-KD2	なし	AGTTTTCTACWGTTGGGATTTTGCCYAAKTTGACTGAAATYAGATGCCTCAGCTTGTTTT	456 ← 515
D197N-BN-C1	5'末端リン酸化	ACARTAATGCAYTRMTCAAAATAAATATGGAGAAGCATAYACTGACAC	597 → 645
D197N-BN-C2	5'末端リン酸化	RGGGCCATCAACTCCGATATAWGTCATTCCYYTACCATCATGGCATGCG	547 ← 595
D197N-BN-DD1	なし	CGCATGCCATGATGGTARRGAATGGACWTATATCGGAGTTGATGGCCCYG	547 → 596
D197N-BN-DD2	なし	GTGTCAGTRIATGCTTCTCCATAITTTATTTTGAKYARTGCATTAYTGTC	596 ← 645
D197N-BN-ND1	なし	CGCATGCCATGATGGTARRGAATGGACWTATATCGGAGTTGATGGCCCYA	547 → 596
D197N-BN-ND2	なし	GTGTCAGTRIATGCTTCTCCATAITTTATTTTGAKYARTGCATTAYTGTT	596 ← 645

・ ポジションは GenBank Accession No.: AB036870 に記載のある遺伝情報の塩基番号と合成の方向 (矢印) を示す。

表 10 R150-D197 検出系

試薬類	使用量 (μl)
DW	8.9
10× Buffer (添付)	2
R150K-BN-C1 (1μM)	1
R150K-BN-C2 (1μM)	1
D197N-BN-C1 (1μM)	1
D197N-BN-C2 (1μM)	1
R150K-BN-RD1 (1μM)	1
R150K-BN-RD2 (1μM)	1
D197N-BN-DD1 (1μM)	1
D197N-BN-DD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・ B 型タミフル感受性型に反応する

表 11 K150-N197 検出系

試薬類	使用量 (μl)
DW	8.9
10× Buffer (添付)	2
R150K-BN-C1 (1μM)	1
R150K-BN-C2 (1μM)	1
D197N-BN-C1 (1μM)	1
D197N-BN-C2 (1μM)	1
R150K-BN-KD1 (1μM)	1
R150K-BN-KD2 (1μM)	1
D197N-BN-ND1 (1μM)	1
D197N-BN-ND2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・ B 型タミフル耐性型に反応する

表 12 インフルエンザウイルス PB2 遺伝子に用いる合成 DNA

名前	修飾	配列 (5'→3')	ポジション
PB2-F	なし	TTTCARTCTYTWGTCCTCCYAAGG	1738→1759
PB2-R	なし	YCCRGMTGTGCTTCATCTG	2036←2055
E627-PB2-C1	5'末端リン酸化	ARCARAGYAGRATGCARTTYTCBTCAYTRACTGTGAATGTGAGRGGATC	1880→1928
E627-PB2-C2	5'末端リン酸化	TGGWGGRGCRGCWGCAARGGRAGAAGYTTTATTATYTGRRYDGTRTCA	1830→1878
E627-PB2-ED1	なし	TGAYACHRYYCARATAATAAARCTTCTYCCYTTTGCWGCYGCYCCWCCAG	1830→1879
E627-PB2-ED2	なし	GATCCYCTCACATTCACAGTYAMTGAVGARAAYTGCATYCTRCTYTGTC	1879←1928
E627-PB2-KD1	なし	TGAYACHRYYCARATAATAAARCTTCTYCCYTTTGCWGCYGCYCCWCCAA	1830→1879
E627-PB2-KD2	なし	GATCCYCTCACATTCACAGTYAMTGAVGARAAYTGCATYCTRCTYTGTT	1879←1928

・ ポジションは GenBank Accession No.: FJ966976 に記載のある遺伝情報の塩基番号と合成の方向 (矢印) を示す。

表 13 E627 検出系

試薬類	使用量 (μl)
DW	12.9
10× Buffer (添付)	2
E627K-PB2-C1 (1μM)	1
E627K-PB2-C2 (1μM)	1
E627K-PB2-ED1 (1μM)	1
E627K-PB2-ED2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・ トリ型の PB2 遺伝子に反応する

表 14 K627 検出系

試薬類	使用量 (μl)
DW	12.9
10× Buffer (添付)	2
E627K-PB2-C1 (1μM)	1
E627K-PB2-C2 (1μM)	1
E627K-PB2-KD1 (1μM)	1
E627K-PB2-KD2 (1μM)	1
9°N DNA Ligase	0.1
PCR 予備増幅産物	1

・ ヒト型の PB2 遺伝子に反応する