

## 45. 薬剤耐性インフルエンザウイルスの LCR 法を用いた鑑別法の開発

○北堀 吉映（奈良県保健環境研究センター）

### 【はじめに】

1990年代以降、アマンタジン、ノイラミニダーゼ阻害薬などの治療薬が開発・承認され、抗インフルエンザ医療体制が構築される時代に入った。この様な状況のなか、2003年には中国でアマンタジンに対する耐性ウイルス(M2 遺伝子領域 31 位、AGT→AAT)が出現し、その後、多くの国と地域でも確認された<sup>1)</sup>。同様に、2007年にはオセルタミビルに対する耐性能を獲得したソ連型インフルエンザ(N 遺伝子領域 275 位、CAC→TAC)が北欧諸国を中心とする地域で確認され、翌シーズンには全世界へと拡大していった。

耐性ウイルスの一塩基置換は、該当部分が制限酵素切断部位と一致している場合は比較的容易に鑑別可能であるが、切断部位と異なる場合は塩基配列判読(シーケンス)以外に有効な手段は見当たらないのが現状である。しかし、シーケンス検索は複雑な作業工程、経費ともに多くの問題を抱えており、それに変わる簡易スクリーニング検索法の開発が待たれている。本研究では、アマンタジン耐性ウイルスを標的とした一塩基置換を鑑別するため Ligase Chain Reaction (LCR) によるスクリーニング法を新たに開発したので報告する。

### 【材料と方法】

#### 1) LCR 法の基本原理

標的遺伝子産物を鋳型として、ハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチドに DNA Ligase を使用して nick を封鎖しようとした場合、結合点が鋳型の配列に対しマッチすれば結合反応が起こり、ミスマッチだと結合反応が起こらない。また、ヌクレオチドが結合した場合は次の反応(サイクル)で鋳型となるため、PCR と同様に増幅反応が起こる。

#### 2) 合成ヌクレオチドと試料

標的遺伝子増幅用プライマー<sup>2)</sup>: For: 5'-CTAGTCAGGCCAGGCAAATG-3、Rev: 5'-ACTGTCGTCAGCATCCACAG-3。5'-末端リン酸化プローブ: HK-M1-C1: 5'-TATCATTGGGATCTTGCACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTT-3、HK-M1-C2: 5'-TCGCGGCAACAACAAGCGGGTCACAAGAATCGTTGCATCTGCACCCCA-3、感受性株検索用: HK-M1-S1: 5'-TGGGGGTGCAGATGCAACGATTCAAGTGACCCGCTTGTGTTGCCGCGAG-3、HK-M1-S2: 5'-AAAAACACGATCAAGAATCCACAATATCAAGTGCAAGATCCCAATGATAC-3、耐性株検索用: HK-M1-N1: 5'-TGGGGGTGCAGATGCAACGATCAAGTGACCCGCTTGTGTTGCCGCGAA-3、HK-M1-N2: 5'-AAAAACACGATCAA

GAATCCACAATATCAAGTGCAAGATCCCAATGATAT-3。反応系試料はシーケンスによって既に確認済みの A 香港型アマンタジン耐性株：A110017、A110026、A110081 および感受性株：A60056、A60059、A60061 を用いた。

### 3) 鋳型標的 M2 遺伝子増幅および LCR

i) 鋳型標的遺伝子増幅：プライマー：For3、Rev を用いて M2 遺伝子領域の RT-PCR (PrimeScript One step RT-PCR kit ver.2、TAKARA、Japan) を行った。温度条件は 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒で 35 サイクル、その後アガロースゲル電気泳動を行い期待される遺伝子産物 (339 bp) を確認し、その後の鋳型遺伝子断片とした。

ii) アマンタジン耐性株による LCR 検出系の最適化検討：鋳型遺伝子断片にプローブとして HK-M1-C1、HK-M1C2、HK-M1-S1、HK-M1-S2 および DNA Ligase (New England Biolabs, Japan) を加えた反応系を調製し上記の鋳型遺伝子断片を加えた。サーマルサイクラーを用いアニーリング温度を 65°C、70°C、75°C の 3 段階について特異性の高い反応系を検討した。

iii) アマンタジン感受性株による LCR 検出系の最適化検討：鋳型遺伝子断片をプローブとして HK-M1-C1、HK-M1C2、HK-M1-N1、HK-M1-N2 および DNA Ligase を加えた反応系を調整し上記の鋳型遺伝子断片を加えた。サーマルサイクラーを用いアニーリング温度を 65°C、70°C、75°C の 3 段階について特異性の高い反応系を検討した。

### 4) LCR 検出系の判定

全ての検体に共通して 50bp の未反応プローブが観察される。それに加えて耐性か感受性のいずれかのゲルには 99bp の結合プローブが観察されること (結合プローブが観察された反応系の逆反応系では観察されない)。

## 【結果】

### 1) 鋳型遺伝子増幅

本県で分離された、既知のアマンタジン耐性株および感受性株を用い M2 遺伝子領域の増幅を試みた。図 1 に示すように期待される 339bp に明らかなバンドを有する遺伝子産物が確認された。

### 2) アマンタジン耐性株による LCR 検出系の最適化検討

既知の耐性ウイルス 3 株を用い、耐性および感受性検出系を適応させ異なるアニーリング温度を設定し評価を行った。結果、耐性 LCR 検出系では全てのアニーリング温度で 99bp の結合プローブが観察されたが、感受性 LCR 検出系では結合プローブの明らかな消失はアニーリング温度の 75°C のみに観察された (図 2)。

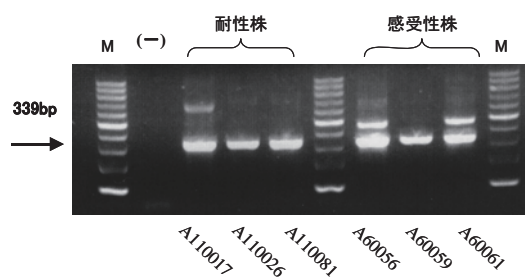


図 1. M2 遺伝子領域の増幅

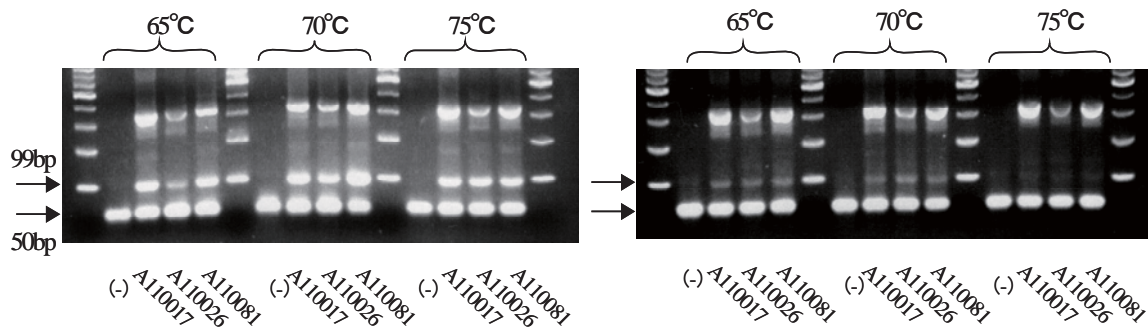


図 2. 耐性株による LCR 検出反応 (左) 耐性検出系、右) 感受性検出系

### 3) アマンタジン感受性ウイルス株による LCR 検出系の最適化検討

感受性ウイルス 3 株を用い、耐性および感受性 LCR 検出系を適応させアニーリング温度を 3 種の異なる温度設定で反応評価を行った。結果、耐性 LCR 検出系では全てのアニーリング温度で 99bp の結合プローブが観察されたが、感受性 LCR 検出系では結合プローブの明らかな消失はアニーリング温度 75°C のみに観察された (図 3)。

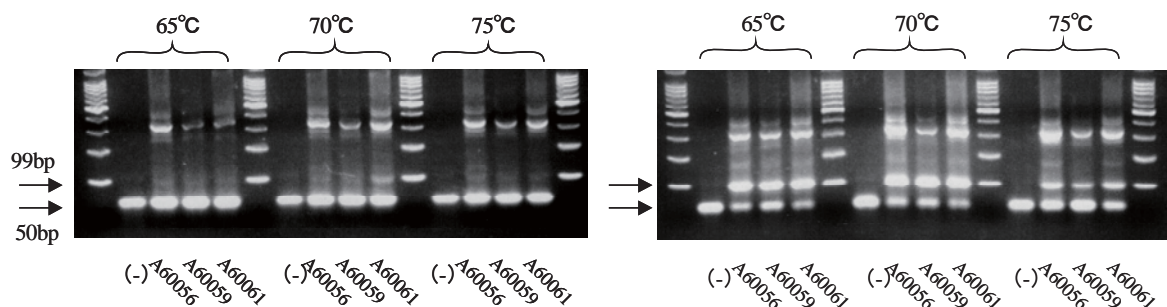


図 3. 感受性性株による LCR 検出反応 (左) 耐性検出系、右) 感受性検出系

#### 【考察】

当研究センターでは県内で流行した A 香港型および A ソ連型インフルエンザについてのアマンタジン耐性ウイルス流行状況を調査し、A 香港型では 2005/06 シーズン以降で高頻度に見られること、また A ソ連型においても 2006/07 シーズンから 2007/08 シーズンの間に高頻度の耐性ウイルスが流行していたことを報告してきた<sup>3,4)</sup>。本研究の目的である一塩基置換鑑別スクリーニング法の開発は、鋳型 DNA に相補的な隣接する 2 本のプローブをアニールさせ、その境界となる一塩基におけるミスマッチの有無を鑑別する LCR 法を基本としたものである。実際には鋳型 DNA が 2 本鎖であるため、4 本のプローブを用いることになる。その際、正確な変異鑑別が可能な精度を確保するため Ligase 反応における特異性を高める為のアニーリング温度の最適化検討を行ったところ、75°C の反応系が良好であった。

LCR 法は遺伝子増幅技術の一つで、その特徴は①特異性が高い、②感度が高い、などが

知られている。今回の開発に際しプローブ等の合成 DNA 作成要領は、斎藤博之 博士（秋田県健康環境センター）が 2009 年厚生労働科学特別研究事業で行ったタミフル耐性鑑別 LCR 法の開発レポート<sup>5)</sup>を参考とし、アマンタジン薬剤耐性特異部位の鑑別法としたものである。本 LCR 法を活用することは結果的には高コストのシーケンサー等の大型機器を用いず、一度に多くの検体を処理できることが可能となる。今後、流行期における薬剤耐性サーベイランスが実質的に機能することで直近の情報が医療関係機関、教育機関等に配信されることで薬剤選択などを通じ感染予防や拡大阻止に大いに貢献するものと考えられた。

#### 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究への助成を頂きました財団法人大同生命厚生事業団に心から深謝申し上げます。

#### 文献

- 1) Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, Cox NJ, Klimov AI: Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366: 1175-1181, 2005
- 2) Kitahori Y, Nakano M, Inoue Y: Frequency of amantadine-resistant influenza A virus isolated from 2001-02 to 2004-05 in Nara Prefecture. *Jpn J Infect Dis* 59:197-199, 2006
- 3) 北堀吉映、今西芳貴、岡山明子、井上ゆみ子、堺 晴美：奈良県における抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの発生状況（2008/09）：オセルタミビルおよびアマンタジン. *臨床とウイルス* 37:207-210、2009
- 4) 北堀吉映、岡山明子、今西芳貴、榮井 毅：抗インフルエンザ薬耐性ウイルスにおける最近の知見. *臨床とウイルス* 38:89-93、2010
- 5) 斎藤博之、田中智之、矢野公一、中西好子、倉田 毅、皆川洋子、北堀吉映、高橋和朗、田中敏嗣、調 恒明、平良勝也：LCR を用いた簡便なタミフル耐性鑑別法の開発. 平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金 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）、2009

経費使途明細

|         |                          |          |
|---------|--------------------------|----------|
| 消耗品     | プライマー(49MER)             | ¥39,860  |
|         | プローブ(20-50MER)           | ¥54,062  |
|         | EX Taq Hot start version | ¥40,635  |
|         | QIAquick PCR kit         |          |
|         | TBE buffer, 10x          |          |
|         | トリアミノメタン                 | ¥39,999  |
|         | フィルターチップ                 |          |
|         | RNA 抽出キット                |          |
|         | ねじロビン                    | ¥30,000  |
|         | 高感度ゲル染色剤                 | ¥55,440  |
| 論文校正、投稿 | 臨床とウイルス                  | ¥30,000  |
| 文具類     | インクカートリッジ 他2品            | ¥10,004  |
|         | 合計                       | ¥300,000 |