

201123038A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

感染症の予防、診断・治療又は医療水準の向上のための臨床的研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 影山 努

平成24（2012）年3月

目 次

I.	総括研究報告	
	感染症の予防、診断・治療又は医療水準の向上のための臨床的研究	P. 1
	研究代表者： 影山 努	
II.	分担研究報告	
1.	マイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法を組み合わせた新規検査法における検出感度の検討	P. 7
	分担研究者： 高山郁代	
	研究協力者： 影山 努	
2.	インフルエンザウイルス核酸検出系の構築	P. 11
	分担研究者： 中内美名	
3.	マイクロ流路チップを用いた遺伝子診断システムの臨床的評価	P. 14
	分担研究者： 大場邦弘	
	研究協力者： 小林匠、甘利昭一郎、生田陽二、林健太、村田岳哉、石川涼子、 内山健太郎、吉田知広、野田絵理、小鍛冶雅之、河野寿夫、小田智三、村瀬享子、 野田一成、大滝美浩、安田順一、青木茂行、澄田奏子、稲川博司、北麻里子、 高山郁代、中内美名、影山努	
4.	RSV 核酸検出系の検討	P. 22
	分担研究者： 松井清彦	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	P. 26

感染症の予防、診断・治療又は医療水準の向上のための臨床的研究

研究代表者 影山 努

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 第2室長

研究要旨

リアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの型・亜型特異的な遺伝子検査は非常に高感度かつ特異的であるが、検査手技が煩雑で特殊機器を必要とするため、検疫所や地方衛生研究所あるいは遺伝子検査ができる設備が整った病院等でしか検査をする事ができなかった。一方、インフルエンザ診断用試薬として Direct RT-LAMP 法による H1pdm および A 型検出キットが市販されているが、Direct RT-LAMP 法は RNA 抽出の簡便化および試薬の乾燥化が図られ従来の RT-LAMP 法と比べると簡便となったが、反応試薬・検体の分注操作にマイクロピペッターを使用するためコンタミネーションのリスクが高く、遺伝子検査に熟練しないと正しく結果を得る事ができない可能性があった。本研究では Direct RT-LAMP 法とソニー株式会社が開発中のマルチウェルを搭載したマイクロ流路チップを組み合わせ、迅速診断キット並の簡単な操作で季節性インフルエンザウイルスの遺伝子検査(同時に型・亜型識別)ができる検査システムを構築し、感度や特異性の評価、臨床検体を用いた評価を行い、臨床現場における本システムの遺伝子診断の有用性について検討を行った。

A. 研究目的

現在、東南アジアや中東では高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒトへの感染が依然として続いており、高病原性鳥インフルエンザウイルスを由来とした新型インフルエンザの出現や、ヒトで流行しているインフルエンザウイルスやブタインフルエンザウイルスとの混合感染により、遺伝子再集合が起きて、より強い病原性を獲得した変異ウイルスの出現が危惧されている。

2009 年に出現したブタインフルエンザに由来する新型インフルエンザは幸運な事に、

病原性が強毒性ではなかったものの、特に 5～9 歳の小児では病初期に急速に進行する呼吸傷害の発現率が高く、治療開始が遅れるとウイルス性肺炎により重症化する可能性があった。新型インフルエンザ発生時は、全国の検疫所・地方衛生研究所へのリアルタイム RT-PCR 法等による遺伝子検査系が導入され、全国での新型インフルエンザ検査体制が確立されたが、病院や診療所等の臨床現場では、検査手技が煩雑で特殊機器も必要なため、遺伝子検査に精通した人員と検査設備が整っている限られた施設でしか検査できなかった。一方で、病院や診療

所等の臨床現場でも簡便に遺伝子診断を行えるように、従来の RT-LAMP 法が一部改良され、検体からの核酸精製を必要としないで、約 45 分で H1pdm および A 型インフルエンザウイルスを検出する Direct RT-LAMP 法による遺伝子診断薬が栄研化学株式会社より発売となっているが、試薬・検体の分注操作にマイクロピペッターが必要なため、まだコンタミネーションのリスクが高く遺伝子検査に熟練しないと正しく結果が得られない可能性があった。H1pdm は、当初警戒されていた高病原性の H5N1 とは異なり、ブタインフルエンザウイルスに由来した弱毒性であったが、小児(特に 5-9 歳)では病初期に急速に進行する呼吸器傷害の発現率が高く、治療開始が遅れるとウイルス性肺炎により重症化する可能性があった。また、迅速診断キットは遺伝子検査法に比べ検出感度が低く、A、B 型以外に亜型を区別する事ができない。

そこで、本研究では、Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせ、煩雑な操作なしで遺伝子検査(同時に亜型診断)ができる高感度な検査システム開発に応用し、ウイルスを用いて感度や特異性の評価、臨床検体を用いて本システムの有用性の臨床的評価を行い、他のウイルス性の呼吸器感染症の鑑別診断法に応用して、特に小児科で臨床的に実用性が高いと考えられる呼吸器感染症の早期診断が可能な遺伝子検査システムの開発を目標とした。この研究によって、インフルエンザウイルスの型・亜型同定のみならず他の呼吸器感染症の診断を高感度、特異的、迅速かつ簡便にベットのサイドで遺伝子診断する事が可能となり、新型インフルエンザ出現および大流行の可能性の予知と早期検出のみならず、あるいはその他の新興・再興感染症の検出の実施にも現場レベルで応用可能となり、感染症の予防、診断・治療といったわが国の感染

症対策に大きく貢献する事が期待される。

研究組織

[研究代表者]

影山 努 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

[研究分担者]

大場邦弘 公立昭和病院小児科

中内美名 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

高山郁代 同上

松井清彦 同上

B. 研究方法

1. 栄研化学株式会社の Direct RT-LAMP 法とソニー株式会社が開発中の小型リアルタイム検出機およびマルチウェル搭載のマイクロ流路チップを組み合わせ、煩雑な操作が必要ない、ベットのサイド診断可能な季節性インフルエンザウイルスの高感度遺伝子検査システム(同時に型、亜型診断可能)の開発をめざし、Direct RT-LAMP 法による A または B 型ならびに A/H1pdm09 または A/H3 亜型の特異的検出法の構築について検討した。

2. Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせた新規検査法と当所で構築した既存の real-time RT-PCR 検出系とで検出感度の比較を行い、新規検査法の特異性および検出感度について検討した。

3. 小児の呼吸器感染症を引き起こす原因ウイルスの一つである Respiratory syncytial virus(RSV)について RT-PCR 法と RT-LAMP 法による核酸検出の感度の比較を行い、RT-LAMP 法が遺伝子診断に有用であるかどうかの検討を行った。

4. Direct RT-LAMP 法に最適化した H5 亜型の検出系を用いて、昨シーズン日本の家禽及び野鳥で流行した Clade 2.3.2、およびベトナムで流行した clade 2.3.4 の H5N1 亜

型高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて検出感度および特異性について検討を行った。

5. 2009/2010年シーズンにインフルエンザ(H1 pdm 2009)に肺炎にまで至り入院加療が必要であった患者のイムノクロマト法(クイックナビ TM—Flu、デンカ生研株式会社)による補助診断について後方視的に検討した。

6. 栄研化学株式会社より市販されているLoopamp A型インフルエンザウイルス検出試薬キット及びLoopamp H1 pdm 2009インフルエンザウイルス検出試薬キットを用いて、Direct RT-LAMP法を用いた診断系の臨床的有用性についての評価を診療現場である外来の一区画で臨床検体を用いて行った。

7. ソニー株式会社が開発中の小型リアルタイム検出機およびマルチウェル搭載のマイクロ流路チップとDirect RT-LAMP法とを組み合わせ、診断系の臨床的有用性についての評価を診療現場である外来の一区画で臨床検体を用いて行った。

C. 研究結果および考察

1) 新たにH3 RT-LAMP法およびTypeB RT-LAMP法の構築を行った。検出感度は、それぞれH3リアルタイムRT-PCR法およびTypeBリアルタイムRT-PCR法と比較して10から100倍低かった。RT-LAMP法はリアルタイムRT-PCR法と比較して10から100倍程度検出感度が低くなる事あり、今回構築した2つの検出系はRT-LAMP法としては十分な検出感度であると考えられた。

また、H3 RT-LAMP法、TypeB RT-LAMP法はそれぞれA/H3亜型インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスを特異的に検出できることから、先に構築されたTypeA RT-LAMP法、H1pdm09 RT-LAMP法と合わせてマイクロ流路チップへの応用が可能と考えられた。

2) A型、B型、A/H1pdm09亜型およびA/H3亜型それぞれについて、Direct RT-LAMP法とマイクロ流路チップを組み合わせた新規検査法は、既存のリアルタイムRT-PCR検出系と比較し、約10倍程度低い検出感度であった。ウイルスRNAを使用した検討においては、型、亜型間での交差反応は認められなかった。また、臨床検体を用いて検討を行った結果、Direct RT-LAMP法とマイクロ流路チップを組み合わせた新規検査法での検査結果は、リアルタイムRT-PCR法による検出系での検査結果とほぼ一致し、臨床検体を使用した検討においても、型、亜型間での交差反応は認められなかった。

Direct RT-LAMP法とマイクロ流路チップを組み合わせた新規検査法での検査結果は、既存のreal-time RT-PCR検出系と比較した、ウイルスRNAを使用した検出感度比較で、約10倍低い検出感度であったものの、既にDirect RT-LAMP法自体がreal-time RT-PCR法と比較して、10~100倍感度が低下することが知られており、Direct RT-LAMP法を使用した検出系をマイクロ流路チップに組み込んでも検出感度には直接影響を及ぼさないと考えられた。

3) 2009/2010シーズンにインフルエンザ(H1 pdm 2009)肺炎患者25例中16例が発熱から24時間以内に入院加療が必要となっているが、イムノクロマト法が陽性となるまでの発熱からの時間は平均25時間であった。イムノクロマト法が陰性でも兄弟に罹患者がおり、臨床的にインフルエンザ(H1 pdm 2009)感染症と診断した1例を除き、24例が最終的にイムノクロマト法でA型陽性となったが、その内の11例が初回検査で陰性であり、イムノクロマト法による診断の問題点が明らかとなった。

4) 2010/2011シーズンにイムノクロマト法でA型陽性となった22例の鼻腔吸引液と鼻腔ぬぐい液を対象に、A型インフルエンザ

ウイルスおよびインフルエンザ (H1 pdm 2009) の検出を Direct RT-LAMP 法により蛍光目視判定法で規定の 35 分間で行った。その結果、Loopamp A 型インフルエンザウイルス検出試薬キットにおいて、全例陽性となりイムノクロマト法の結果と一致した。また、Loopamp H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出試薬キットにおいて、22 例中 15 例が陽性となり、リアルタイム RT-PCR 法の結果とも一致した。また、Loopamp H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出試薬キットで陰性であった 7 例は、リアルタイム RT-PCR 法により全て H3 と判定された。また、蛍光目視判定法より短時間で正確な判定を行うために、対象の 22 例中 12 例の同一検体を対象に、リアルタイム濁度測定装置を用いて Loopamp A 型インフルエンザウイルス検出試薬キットで再検査を実施した結果、蛍光目視判定法と一致した結果が得られた。以上の結果より臨床検体でも Direct RT-LAMP 法による遺伝子診断はリアルタイム RT-PCR 法と同等の検出精度である事が明らかとなった。

5) 2011/2012 シーズンに同意が得られた 47 例 (鼻腔ぬぐい液 11 例と鼻かみ液 36 例) を対象に、ソニー株式会社が開発中の小型リアルタイム検出機およびマルチウェル搭載のマイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法とを組み合わせ、A 型、B 型、H3 亜型、H1 pdm 2009 亜型の判定を行った結果、A 型に関しては、47 例中 33 例が陽性と判定され、リアルタイム RT-PCR 法の結果と一致した。33 例中 3 例がイムノクロマト法陰性であった。A 型陽性のうち 31 例が H3 亜型陽性と判定され、リアルタイム RT-PCR 法の結果と一致した。A 型が陽性であったにも関わらず、亜型が判定できなかった検体が 2 例あったが、リアルタイム RT-PCR 法により H3 亜型である事が判明した。この 2 例は、共に抗ウイルス薬投与

後の検体であり、ウイルス量が比較的少ないために Direct RT-LAMP 法では検出できなかったと考えられた。2011/2012 シーズンに H1 pdm 2009 亜型陽性と判定された症例は Direct RT-LAMP 法においてもリアルタイム RT-PCR 法においてもなかった。B 型に関しては、抗ウイルス薬の投与の有無に関わらず、対象の 47 例中 5 例が陽性と判定され、リアルタイム RT-PCR 法の結果とも一致した。以上の結果より、マルチウェル搭載のマイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法は臨床検体を用いた場合でもリアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等の検出精度である事が明らかとなった。

6) 既存のリアルタイム RT-PCR 法および RT-LAMP 法による RSV の検出法について検討を行った結果、リアルタイム RT-PCR 法では理論上ウイルス RNA が含まれていない濃度でも Ct 値が認められ、低濃度では正しく測定できていない事が判明し、新たなリアルタイム RT-PCR 法の構築が必要と考えられた。RT-LAMP 法の評価も新たに構築したリアルタイム RT-PCR 法と比較して行う必要があると考えられた。

7) Direct RT-LAMP 法に最適化した H5 亜型の検出系は、従来に我々が構築したリアルタイム RT-PCR 法による H5 亜型の検出系と比べ、約 10 倍低い検出感度であったが、従来の流行株のみならず最近の流行株も検出が可能であった。

D. 結論

Direct RT-LAMP 法とマルチウェル搭載のマイクロ流路チップを組み合わせ、煩雑な操作を必要としないで迅速診断キット並の簡便な操作で、高感度に季節性インフルエンザウイルスの型・亜型診断を同時に行う事ができる遺伝子検査システム(A 型 B 型の型別ならびに A/H1pdm09 亜型 A/H3 亜型を同時に型、亜型診断が可能)を構築した。

従来よりも煩雑な操作なしで遺伝子検査ができるようになり、従来の遺伝子検査に必要な高度なスキルが無くても、高感度かつ特異性の高い遺伝子検査が臨床現場で可能でありまた、同時に複数の遺伝子を検出する事も可能になるため、季節性インフルエンザの診断のみならず、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの診断にも利用可能であり、特に小児科で臨床的に実用性が高いと考えられる呼吸器感染症の早期診断法の開発にも有用と考えられる。

このシステムを用いる事により臨床現場では検査や問診にかかる時間や人員を大幅に少なくする事ができるため、特に医療崩壊につながる医師等の疲弊の軽減にもつながり、医師不足が深刻な小児科などではその分人的資産の活用ができ、また検査精度が高いため医師等の感染症診断の技術水準向上にも寄与できる。本研究は感染症から国民の健康を守るという観点において、わが国の感染症対策に大きく貢献すると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Takayama I, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K, Yoneda M, Kai C; The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, In Press, 2012

Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. ; Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*.

83(7):1121-1127, 2011

Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S; Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods*. In press, 2012

大場邦弘, 小林匠, 甘利昭一郎, 生田陽二, 石川涼子, 滝有希子, 内山健太郎, 吉田知広, 野田絵理, 河野寿夫, 松井清彦, 高山郁代, 中内美名, 影山努: Reverse transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法を用いた A 型および H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出キットの臨床的有用性の検討. *小児科臨床* 65; 275-279, 2012

生田陽二, 甘利昭一郎, 小田新, 石川涼子, 滝有希子, 内山健太郎, 吉田知広, 大場邦弘, 野田絵理, 河野寿夫: 2009/2010 年シーズンパンデミックインフルエンザ A (H1N1) 2009 肺炎 25 症例の検討. *小児科臨床* 64; 2349-2354, 2011

2. 学会発表

Ikuyo Takayama, Shinichi Shimada, Mina Nakauchi, Toshitaka Minegishi, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Ikuyo Takayama, Emi Takashita, Miho Ejima, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri and Masato

Tashiro: Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A/H1N1pdm09 viruses in Japan. Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance, Rio de Janeiro, November, 2011

Emi Takashita, Miho Ejima, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Masato Tashiro, Takato Odagiri: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Mina Nakauchi, Emi Takashita, Masato Tashiro, Hidekazu Nishimura, Eri Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of pandemic influenza H1N1pdm09 virus, recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kakyoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Koichiro Iha, Mina Nakauchi, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki

Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa: Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fevr using recombinant antigens. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

マイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法を組み合わせた

新規検査法における検出感度の検討

研究分担者 高山郁代 国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター 研究員

研究協力者

影山 努：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 第2室室長

研究要旨 インフルエンザウイルスの型、亜型別診断をベッドサイドで行うことを目指し、マイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法を組み合わせた新規検査法の開発を進めている。本研究では、この新規検査法における検出感度の検討を行った。結果、検査法としては十分な検出感度が備えられていることが示された。

A. 研究目的

現在、臨床現場でのインフルエンザの診断には、広く迅速診断キットが使用されているが、A 型もしくは B 型の型別診断しかできないものが主流な上、十分な感度を備えているとは言い難い。また、臨床現場で核酸精製行程なしに A 型ならびに A/H1pdm09 亜型を遺伝子検査する方法としては、当所も開発に関わった Direct RT-LAMP 法を使用した体外診断用医薬品がある。しかし、ピペット操作を含むことや専用機器が必要であること等からベッドサイドでの検査には不適な面もある。それらの問題点を踏まえて、マイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法を組み合わせ、検査機器の小型化、簡便化を目指しているところである。本研究では、マイクロ流路チップに Direct RT-LAMP 法による各型、亜型の

検出系を組み込んだ場合の検出感度について検討を行った。

また、Direct RT-LAMP 法に最適化した H5 亜型の検出系を用いて、昨シーズン日本の家禽及び野鳥で流行した Clade 2.3.2、およびベトナムで流行した clade 2.3.4 の H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて検出感度および特異性について検討を行った

B. 研究方法

1. 既存の検出系との検出感度の比較

A 型、B 型、A/H1pdm09 亜型および A/H3 亜型それぞれについて、マイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法を組み合わせた新規検査法と当所で構築した既存の real-time RT-PCR 検出系との間で検出感度の比較を行った。新規検査法と既存の real-time

RT-PCR 検出系では、1回の検査系あたりの容量が異なるため、比較に際しては、インフルエンザウイルスから抽出した RNA を使用し、1回の検査系に含まれる総 RNA 量を揃えて比較検討を行った。

2. 臨床検体での検出精度および特異性の確認

臨床検体計 30 検体を使用して、新規検査法でインフルエンザウイルスの検出を行った。また、それぞれ同じ患者由来の検体から RNA を抽出し、既存の real-time RT-PCR 検出系を使用した検査を行い、結果の比較を行った。

(倫理面への配慮)

全ての臨床検体は、インフォームドコンセントを取り、採取を行ったものである。

3. Direct RT-LAMP 法に最適化した H5 亜型の検出系を用いて、昨シーズン日本の家禽及び野鳥で流行した Clade 2.3.2、およびベトナムで流行した clade 2.3.4 の H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて検出感度および特異性について検討を行った。

C. 研究結果

1. 既存の検出系との検出感度の比較

A 型、B 型、A/H1pdm09 亜型および A/H3 亜型それぞれについて、新規検査法は、既存の real-time RT-PCR 検出系と比較し、約 10 倍低い検出感度であった。また、ウイルス RNA を使用した上記の検討において、型、亜型間での交差反応は認められなかった。

2. 臨床検体での検出精度および特異性の確認

今回使用した 30 検体について、新規検査法では、A/H3 亜型陽性 19 検体、B 型陽性

2 検体、陰性 9 検体という結果だった。また、同じ患者由来の検体を既存の real-time RT-PCR 検出系で検査したところ、A/H3 亜型陽性 19 検体、B 型陽性検体 1 検体、陰性 10 検体という結果となった。

これらの臨床検体を使用した検討においても、型、亜型間での交差反応は認められなかった。

3. Direct RT-LAMP 法に最適化した H5 亜型の検出系の確認

従来に我々が構築したリアルタイム RT-PCR 法による H5 亜型の検出系と比べ、約 10 倍低い検出感度であったが、従来の流行株のみならず最近の流行株も検出が可能であった。

D. 考察

ウイルス RNA を使用した検出感度の検討では、新規検査法は、既存の real-time RT-PCR 検出系と比較し、約 10 倍低い検出感度であったものの、既に Direct RT-LAMP 法自体が real-time RT-PCR 法と比較して、10~100 倍感度が低下することが知られている。このことを踏まえると、今回の結果から、Direct RT-LAMP 法を使用した検出系をマイクロ流路チップに組み込んでも検出感度には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

また、臨床検体を使用した検討において、新規検出法で B 型陽性となった 1 検体が既存の real-time RT-PCR 検出系の検査結果では陰性と判定された。しかし、この臨床検体は、発症後長期間経った後に採取した検体であったこと、また、同患者の別に採取した検体で行った迅速診断キットでの結果が B 型陽性であったことから、ウイルス量が非常に少ない検体で、既存の real-time RT-PCR 検出系に対し、偶然、検出限界付近の RNA 量しか含まれなかったものと考

えられた。この1検体以外の検体では、新規検査法と既存の real-time RT-PCR 検出系での検査結果の間に齟齬はなかった。以上のことから、新規検査法は、臨床検体を使用した検査において十分な検出感度を備えていると考えられた。

Direct RT-LAMP 法に最適化した H5 亜型の検出系では昨シーズン日本の家禽及び野鳥で流行した Clade 2.3.2、およびベトナムで流行した clade 2.3.4 の H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスも検出可能であった。

E. 結論

今回の研究から、Direct RT-LAMP 法をマイクロ流路チップに組み込んだ新規検査法は検出感度の面で問題点は特に見当たらず、実用化されれば、臨床現場でベッドサイド診断が可能になると考えられる。季節性インフルエンザの診断のみならず、H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの診断にも利用可能であり、特に小児科で臨床的に実用性が高いと考えられる呼吸器感染症の早期診断法の開発にも有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takayama I, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K, Yoneda M, Kai C; The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, In Press, 2012

Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. ; Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic

influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*. 83(7):1121-1127, 2011

2. 学会発表

Ikuyo Takayama, Shinichi Shimada, Mina Nakauchi, Toshitaka Minegishi, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Ikuyo Takayama, Emi Takashita, Miho Ejima, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Takato Odagiri and Masato Tashiro: Improved surveillance system to detect antiviral-resistant influenza A/H1N1pdm09 viruses in Japan. *Influenza Antivirals: Efficacy and Resistance*, Rio de Janeiro, November, 2011

Emi Takashita, Miho Ejima, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Masato Tashiro, Takato Odagiri: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

インフルエンザウイルス核酸検出系の構築

研究分担者 中内美名 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター研究員

研究要旨 Direct RT-LAMP 法とマイクロ流路チップを組み合わせ、煩雑な操作をする事無く、高感度かつベツトサイド診断可能なインフルエンザウイルス遺伝子検査システム(同時に型、亜型診断可能)の開発をめざし、A 型 B 型の型別ならびに A/H1pdm09 亜型 A/H3 亜型の亜型別特異的検出法を Direct RT-LAMP 法を用いて構築する事を目的とする。

A. 研究目的

病院や診療所等の臨床現場でのインフルエンザ遺伝子検査を可能とするため、従来の RT-LAMP 法を一部改良し、検体からの核酸精製を必要とせず、約 45 分で A 型インフルエンザウイルスおよび A/H1pdm09 亜型インフルエンザウイルスを特異的に検出する Direct RT-LAMP (TypeA RT-LAMP および H1pdm09 RT-LAMP) 法による診断薬の開発を栄研化学(株)と共同で行ってきた (Nakauchi ら Journal of Medical Virology 83:10-15, 2011)。一方現在ヒトの間で流行するインフルエンザウイルスには、上記の A/H1pdm09 亜型に加え、A/H3 亜型および B 型インフルエンザウイルスが存在する。インフルエンザ感染症を包括的に診断するためには、上記のインフルエンザウイルスそれぞれを特異的に検出する Direct RT-LAMP 法が必要なため、A/H3 亜型および B 型インフルエンザウイルス検出法を構築することを目的とする。

B. 研究方法

1. プライマーの設計

過去 5 年間に流行した A/H3 亜型および B 型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子配列 (A/H3 亜型検出用) および NS 遺伝子配列 (B 型検出用) のアライメントを作成し、比較的保存されている領域を元にプライマーセットを設計した。

2. 検出感度および特異性の検討

これまで国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターで構築した real-time RT-PCR 検出系 (A/H3 亜型検出用:H3 rtRT-PCR, B 型検出用:TypeB rtRT-PCR) と比較する事により、構築したプライマーセットを用いた Direct RT-LAMP 法の検出感度の検討を行った。また、近年ヒト間で流行しているインフルエンザウイルスから抽出した RNA を用いて特異性の検討を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1. 設計したプライマーセット

A/H3 亜型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット、H3F3: CCTTGATGGAGAAAAGTCCAGTC, H3L3: CGTTTTGAGTGGAGAAAAGTCCAGTC, H3FIP: GCGTTCAACAAAAAGGTCCCATT(TT)C TAATAGATGCTCTATTGGGAGAC, H3BIP: GTTACCCTTATGATGTGCCGGATT(TT)CT TTCATTGTAAACTCCAGTG, H3FL: TTGGAAGCCATCACACTGAG, H3LB: TCACTAGTTGAATCATCCGG。

B 型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット、BF3: GCAACCAATGCCACCATA, BL3: TTCTCTCTTCAAGRGACATC, BFIP: TAGTCAAGGGCTCTTTGCCA/CTTTGAAG CAGGAATTCTGGA, BBIP: CAAGACCGCCTAAACAGACTAAA/CTTT TACTTTTCAAGGCTCACTT, BFL: TGAAAGYCTTTCATAGCAC, BLB: GARTCAAGAATAAAGACTCACAAC。

2. 感度および特異性の確認

設計したプライマーを用いた A/H3 亜型インフルエンザウイルス Direct RT-LAMP (H3 RT-LAMP) 法および B 型インフルエンザウイルス Direct RT-LAMP (TypeB RT-LAMP) 法は、それぞれ H3 rtRT-PCR 法 (検出感度約 10 copies/reaction) および TypeB rtRT-PCR 法 (検出感度約 10 copies/reaction) に比べ 10 から 100 倍低い検出感度であった。

H3 RT-LAMP 法は A/H3 亜型インフルエンザウイルスを特異的に検出し、A/H1pdm09 亜型および B 型インフルエンザウイルスとの交差反応は無かった。また、TypeB RT-LAMP 法は B 型インフルエンザウイルスを特異的に検出し、A/H1pdm09 および A/H3 亜型インフルエンザウイルスとの交差反応は無かった。

D.& E. 考察と結論

構築した H3 RT-LAMP 法および TypeB RT-LAMP 法の検出感度は、それぞれ H3 rtRT-PCR 法および TypeB rtRT-PCR 法と比較して 10 から 100 倍低かった。一方 RT-LAMP 法は real-time RT-PCR 法と比較して 10 から 100 倍程度検出感度が低い事が知られており、今回構築した 2 つの検出系は RT-LAMP 法としては十分な検出感度であると考えられる。また、H3 RT-LAMP 法、TypeB RT-LAMP 法はそれぞれ A/H3 亜型インフルエンザウイルスおよび B 型インフルエンザウイルスを特異的に検出できることから、先に構築された TypeA RT-LAMP 法、H1pdm09 RT-LAMP 法と合わせてマイクロ流路チップへの応用が可能と考えられる。今回構築された 2 つの系はベツトサイド診断可能な遺伝子検査システムの開発へ向けた検出系として大変有用であると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T; the influenza virus surveillance group of Japan. Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay. *Journal of Medical Virology*. 83(7):1121-1127, 2011

Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S; Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *Journal of Virological Methods*.

In press, 2012

2. 学会発表

Mina Nakauchi, Emi Takashita, Masato Tashiro, Hidekazu Nishimura, Eri Nobusawa: Analysis of antigenic sites on the HA protein of pandemic influenza H1N1pdm09 virus, recognized by human antibody. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Hideki Asanuma, Mina Nakauchi, Kakyoko Sato, Eri Nobusawa, Akira Ainai, Norio Yamamoto, Nami Konomi, Hideki Hasegawa, Masato Tashiro: Comparison of influenza A/H1N1pdm09 vaccine productions in eggs versus cell cultures and the protective immune responses induce in mice. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Koichiro Iha, Mina Nakauchi, Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Momoko Ogata, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Victor Romanowski, Delia A Enria, Shigeru Morikawa: Establishment of serological diagnosis of Argentine hemorrhagic fevr using recombinant antigens. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Ikuyo Takayama, Shinichi Shimada, Mina Nakauchi, Toshitaka Minegishi, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama: A quantitative definition of the 275H and 275Y proportion in neuraminidase of the pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by real-time duplex RT-PCR assay. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

Emi Takashita, Miho Ejima, Ikuyo Takayama, Mina Nakauchi, Seiichiro Fujisaki, Namhee Kim, Noriko Kishida, Hong Xu, Hiromi Sugawara, Reiko Itoh, Teruko Doi, Tsutomu Kageyama, Masato Tashiro, Takato Odagiri: Detection of antiviral-resistant pandemic influenza A(H1N1)2009 (A/H1N1pdm09) Viruses by a combination of chemiluminescent and fluorescent neuraminidase inhibitor susceptibility assays in JAPAN. XV International Congress of Virology, Sapporo, September, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

マイクロ流路チップを用いた遺伝子診断システムの臨床的評価

研究分担者 大場邦弘 公立昭和病院小児科

研究協力者

小林匠、甘利昭一郎、生田陽二、林健太、村田岳哉、石川涼子、
内山健太郎、吉田知広、野田絵理、小鍛治雅之、河野寿夫
：公立昭和病院小児科

小田智三：公立昭和病院感染症科

村瀬享子、野田一成、大滝美浩、安田順一、青木茂行：公立昭和病院呼吸器内科

澄田奏子、稲川博司：公立昭和病院救急科

北麻里子：公立昭和病院産婦人科

高山郁代、中内美名、影山努：国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター

研究要旨 現在、インフルエンザ感染症の診断にはイムノクロマト法による迅速検査が多用されているが、遺伝子検査に比べ検出感度は低い。特にウイルス排出量が少ない病初期は陰性となり、適切なタイミングで治療を受けられないケースも散見される。リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子検査は、型・亜型特異的な高感度の検出系であるが、検査手技が煩雑で特殊機器を必要とするため、検査設備の整った限られた施設でしか検査ができない。一方、病院や診療所等の臨床現場で簡便に診断を行えるように開発された栄研化学株式会社の Direct RT-LAMP 法による遺伝子検査は、試薬・検体の分注操作にマイクロピペッターが必要でコンタミネーションのリスクが高く、遺伝子検査に熟練しないと正しく結果が得られない可能性がある。本研究では、それらの欠点を克服するために、ソニー株式会社が開発中の小型リアルタイム検出機およびマルチウェル搭載のマイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法とを組み合わせた遺伝子検査システムを用いた研究手法を構築し、臨床現場である外来の一画で臨床検体を用いて評価した。

その結果、新たに構築した遺伝子検査システムは、イムノクロマト法と同等の簡単な操作性が確保され、コンタミネーションもなく、リアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等の検出頻度で、インフルエンザウイルスの型・亜型を同時に、そして迅速に同定できることを臨床現場においても確認できた。今後、本検査の普及によりインフルエンザの早期発見ができ、感染予防と治療に有用になるものと考えられる。

A. 研究目的

インフルエンザ (H1 pdm 2009) は、5-9 歳の小児の病初期で急速に進行する呼吸障害の発現率が他の亜型に比べると高い。診断にイムノクロマト法による迅速検査が多用されているが、遺伝子検査に比べ検出感度は低く、A、B 型とインフルエンザ (H1 pdm 2009) 以外の亜型を区別する事はできない。特にウイルス排出量が少ない病初期は陰性となり、適切な治療を受けられないでウイルス性肺炎に至るケースも散見された。一方、リアルタイム RT-PCR 法等の遺伝子検査は、型・亜型特異的な高感度の検出系であるが、検査手技が煩雑で特殊機器を必要とするため、検査設備の整った限られた施設でしか検査ができない。そのため、病院や診療所等の臨床現場で診断を行えるように、リアルタイム RT-PCR 法に比べ、簡便・迅速であり、かつリアルタイム RT-PCR 法とほぼ同等の検出頻度である RT-LAMP 法を一部改良し、検体からの核酸精製を必要とせず、約 45 分で A 型インフルエンザウイルスおよびインフルエンザ (H1 pdm 2009) を検出する Direct RT-LAMP 法による診断系が栄研化学株式会社より販売されている。しかし、試薬・検体の分注操作にマイクロピペッターが必要であり、コンタミネーションのリスクも高く、遺伝子検査に熟練しないと正しく結果が得られない可能性があった。本研究では、それらの欠点を克服するために、ソニー株式会社が開発中であるマルチウェル搭載のマイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法とを組み合わせ、バッテリー駆動が可能な卓上型の

小型のリアルタイム検出機を使用して、イムノクロマト法並の簡単な操作で、インフルエンザウイルスの型・亜型を同時に判定できる遺伝子検査手法を構築したので、その有用性について、診療現場である外来の一画で臨床検体を用いて評価を行った。なお、臨床検体は、国立感染症研究所および公立昭和病院の医学研究倫理委員会による倫理審査の承認を得てから提供者に十分な説明を行い、自由意思による同意を得て採取し本研究に用いた。

B. 研究方法

1. イムノクロマト法による診断の問題点の検討

2009/2010 年シーズンにインフルエンザ (H1 pdm 2009) によって肺炎にまで至り、当院小児科で入院加療が必要であった患児 25 例におけるイムノクロマト法 (クイックナビTM-Flu、デンカ生研株式会社) による補助診断について後方視的に検討し、問題点を明らかにした。

2. Direct RT-LAMP 法 (栄研化学株式会社) の臨床的有用性の検討

栄研化学株式会社と共同開発した Loopamp[®] A 型インフルエンザウイルス検出試薬キット及び Loopamp[®] H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出試薬キットを使用して Direct RT-LAMP 法を用いた診断系の臨床的有用性についての評価を 2011 年 11 月までの間、診療現場である外来の一画で、臨床検体を用いて行った。

3. マルチウェル搭載のマイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法の臨床的

有用性の検討

ソニー株式会社が開発中の小型リアルタイム検出機およびマルチウェル搭載のマイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法とを組み合わせたものを用い、診断系の臨床的有用性についての評価を 2011 年 12 月から 2012 年 2 月までの間、診療現場である外来の一区画で、臨床検体を用いて行った。

C. 研究結果

1. イムノクロマト法による診断の問題点

2009/2010 シーズンにインフルエンザ (H1 pdm 2009) 肺炎患者 25 例中 16 例が発熱から 24 時間以内に入院加療が必要となっているが、イムノクロマト法が陽性となるまでの発熱からの時間は平均 25 時間であった。イムノクロマト法が陰性でも兄弟に罹患者がおり、臨床的にインフルエンザ (H1 pdm 2009) 感染症と診断した 1 例を除き、24 例が最終的にイムノクロマト法で A 型陽性となったが、その内の 11 例が初回検査で陰性であった。初回検査陰性の発熱からの時間はいずれも 24 時間以内であり、うち 1 例は 2 回目 (53 時間) も陰性、3 回目 (77 時間) でようやく陽性となった。

2. Direct RT-LAMP 法 (栄研化学株式会社) の臨床的有用性

2010/2011 シーズンに同意が得られたイムノクロマト法で A 型陽性であった 22 例の鼻腔吸引液と鼻腔ぬぐい液を対象に、A 型インフルエンザウイルスおよびインフルエンザ (H1 pdm 2009) の検出を蛍光目視判定法で規定の 35 分間で行った。その結果、Loopamp[®] A 型インフルエン

ザウイルス検出試薬キットにおいて、全例陽性という結果であり、イムノクロマト法と一致した結果が得られた。また、Loopamp[®] H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出試薬キットにおいて、22 例中 15 例が陽性であり、国立感染症研究所で実施したリアルタイム RT-PCR 法の結果と一致した。また、Loopamp[®] H1 pdm 2009 インフルエンザウイルス検出試薬キットで陰性であった 7 例は、リアルタイム RT-PCR 法により全て H3 と判定された。

また、蛍光目視判定法より短時間で正確な判定を行うために、対象の 22 例中 12 例の同一検体を対象に、リアルタイム濁度測定装置を用いて Loopamp[®] A 型インフルエンザウイルス検出試薬キットで再検査を実施した。結果、蛍光目視判定法と一致した結果が得られた。

3. マルチウェル搭載のマイクロ流路チップを用いた Direct RT-LAMP 法の臨床的有用性

2011/2012 シーズンに同意が得られた 47 例 (鼻腔ぬぐい液 11 例と鼻かみ液 36 例) を対象に、ソニー株式会社が開発中の小型リアルタイム検出機およびマルチウェル搭載のマイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法とを組み合わせ、typeA、typeB、H3、H1 pdm 2009 の判定を行った (表 1)。typeA に関しては、47 例中 33 例が陽性と判定され、リアルタイム RT-PCR 法の結果と一致した。33 例中 3 例がイムノクロマト法陰性であり、2 例が抗ウイルス薬投与前、もう 1 例が投与後の検体であった。typeA の亜型に関しては、31 例が H3 陽性と判定され、リアルタイ

ム RT-PCR 法の結果と一致した。typeA が陽性であったにも関わらず、亜型が判定できなかった検体が 2 例あり、リアルタイム RT-PCR 法の結果は H3 であった。その 2 例は、共に抗ウイルス薬投与後の検体であった。2011/2012 シーズンに H1 pdm 2009 陽性と判定された症例は Direct RT-LAMP 法においてもリアルタイム RT-PCR 法においてもなかった。typeB に関しては、抗ウイルス薬の投与の有無に関わらず、対象の 47 例中 5 例が陽性と判定され、リアルタイム RT-PCR 法の結果とも一致した。また、イムノクロマト法で typeB 陽性と判定されたが、Direct RT-LAMP 法およびリアルタイム RT-PCR 法が共に陰性であった抗ウイルス薬投与前の検体が 1 例あった。対象の 47 例中 8 例はイムノクロマト法、Direct RT-LAMP 法、リアルタイム RT-PCR 法すべて陰性であった。

また、typeA、typeB、H3 の陽性判定までの時間について検討した。typeA に関しては、抗ウイルス薬の投与の有無に関わらず Direct RT-LAMP 法が陽性であった 33 例の陽性判定までの時間は、中央値 11 分（範囲 7 分～24 分）であった。また、typeA が陽性であった抗ウイルス薬投与前の 22 例を対象に、発熱から検査を実施するまでの時間を検討した結果、中央値 6.5 時間（範囲 1～60 時間）であった。そして、抗ウイルス薬投与前のイムノクロマト法陽性であった 20 例とウイルス量が比較的少ないと考えられたイムノクロマト法陰性の 2 例および抗ウイルス薬投与後の 11 例の陽性判定までの時間について検討した結果、抗ウイルス薬投与前のイムノ

クロマト法陽性であった 20 例の陽性判定時間は中央値 9 分（範囲 7～15 分）であった。そして、ウイルス量が比較的少ない検体の判定時間はそれよりも長くなる傾向にあった（図 1）。H3 の抗ウイルス薬投与前のイムノクロマト法陽性であった 20 例の陽性判定時間は、中央値 15 分（範囲 11～18 分）であり、typeA 自体よりも判定時間が長くなる傾向にあり、また、ウイルス量が比較的少ない検体の判定時間は typeA と同様にさらに判定時間が長くなる傾向にあった（図 2）。typeB に関しては、更なる症例数の蓄積が必要ではあるが、抗ウイルス薬の投与の有無に関わらず、陽性判定時間は中央値 8 分（範囲 7～9 分）であり、10 分以内に陽性判定をすることができた（図 3）。

D. 考案

現在、インフルエンザ感染症の診断にはイムノクロマト法による迅速検査が多用されているが、遺伝子検査に比べ検出感度は低い。特にウイルス排出量が少ない病初期は陰性となり、適切なタイミングで治療を受けられないケースも散見される。リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子検査は、型・亜型特異的な高感度の検出系であるが、検査手技が煩雑で特殊機器を必要とするため、検査設備の整った限られた施設でしか検査ができない。一方、病院や診療所等の臨床現場で簡便に診断を行えるように開発された栄研化学株式会社の Direct RT-LAMP 法による遺伝子検査は、試薬・検体の分注操作にマイクロピペッターが必要でコンタミネーションのリスクが高く、遺伝子検査に熟練しないと正しく結果

が得られない可能性がある。今回、それらの欠点を克服するために、ソニー株式会社が開発中の小型リアルタイム検出機およびマルチウェル搭載のマイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法とを組み合わせ、免疫クロマト法並の簡単な操作で、同時に型・亜型識別のできる遺伝子検査手法を構築し、臨床現場である外来の一角で実施することで有用性を検討した。

実際、2010/2011 シーズンに栄研化学株式会社の Direct RT-LAMP 法による遺伝子検査を外来の一角で実施するにあたり、手技に熟練していない医師が検査手技の練習を反復して行ったが、その際にコンタミネーションによる偽陽性が頻発してしまい、コンタミネーションの原因となる増幅した遺伝子産物のクリーンアップを行うなどして正常に遺伝子検査が出来るようになるまでに数週間を要した経験をした。2011/2012 シーズンに同じ外来の一角で実施したソニー株式会社の Direct RT-LAMP 法による遺伝子検査の手技は、検体を採取した綿棒を抽出液の入ったチューブに浸し、それをマルチウェル搭載のマイクロ流路チップに直接注入した後に、卓上型の小型検出器にチップをセットする操作だけであり、検査後の増幅した遺伝子産物はチップに密閉されたまま廃棄できるため原理的にもコンタミネーションが起きる可能性は非常に低い。今回はコンタミネーションをおこすことなく、リアルタイムに結果を判定することができたため、免疫クロマト法と同等の操作性でありながら、遺伝子検査のゴールドスタンダードであるリアルタイム RT-PCR 法と完全に一致した結果が抗ウイルス薬投与

前の検体で得られたため、リアルタイム RT-PCR 法と同等の検出頻度であると考えられた。また、陰性判定までの時間は、現時点では 30 分の時間が必要であるが、陽性判定までの時間に関しては、ソニー株式会社の Direct RT-LAMP 法による遺伝子検査は早く、免疫クロマト法の判定時間にも引けを取らない印象であった。

今回、臨床現場においてソニー株式会社の小型リアルタイム検出機およびマイクロ流路チップと栄研化学株式会社の Direct RT-LAMP 法の組み合わせによる遺伝子検査を実施することにより、病初期（発熱 1 時間と 3 時間）のためにウイルス排出量が少なく、免疫クロマト法で陰性判定であった 2 例を確実に陽性判定することができ、早期に治療に結びつける事ができた。また、5 例に関しては院内感染対策の面から、高感度である遺伝子検査結果の恩恵にあずかる事ができ、有用であった。そして、免疫クロマト法では鼻腔ぬぐい液よりも感度が落ちる鼻かみ液の検体でも十分にリアルタイム RT-PCR 法と一致した検査結果が得られたため、インフルエンザ感染症の診療において、患者への侵襲性の少ない優しい医療を実現することができる検査であると考えられた。

E. 結論

今回、新たに構築したソニー株式会社の小型のリアルタイム検出機およびマイクロ流路チップと Direct RT-LAMP 法を組み合わせた遺伝子検査手法は、免疫クロマト法と同等の簡単な操作性が確保され、コンタミネーションもなく、リアルタイム RT-PCR 法と同等の検出頻度であり、同